

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Universitätsklinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Freisetzung von endogenem G-CSF als möglicher Mechanismus der
kardioprotektiven Effekte von PTH**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Weinberger
aus München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Fassnacht

Prof. Dr. Sabine Steffens

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Stefan Brunner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.3.2014

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	Myokardinfarkt	9
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarktes	9
1.1.2	Pathophysiologische Veränderung des Herzens nach Myokardinfarkt	10
1.2	Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt.....	13
1.2.1	Arten von Stammzellen	13
1.2.1.1	Pluripotente Stammzellen	14
1.2.1.1.1	Embryonale Stammzellen	14
1.2.1.1.2	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS).....	15
1.2.1.2	Adulte Stammzellen.....	15
1.2.2	Mechanismen der Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt.....	17
1.2.3	Applikationsweise der Stammzellen	19
1.2.3.1	Direkte Injektion von Stammzellen	19
1.2.3.2	Endogene Stammzelltherapie	20
1.2.3.2.1	Mobilisation von Stammzellen	20
1.2.3.2.2	Homing von Stammzellen	25
1.3	Parathormon.....	28
1.3.1	Wirkung auf das kardiovaskuläre System.....	28
1.3.2	Einsatz von PTH in der endogenen Stammzelltherapie	29
1.4	Fragestellung	31
2	MATERIAL UND METHODEN.....	32
2.1	Material	32
2.1.1	Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	32
2.1.2	Antikörper	32
2.1.3	Färbungen	33
2.1.4	Pharmaka	33
2.1.5	Operationszubehör.....	34
2.1.6	Labor	35
2.1.7	Hämodynamik	36
2.1.8	Histologie.....	36
2.1.9	Soft-und Hardware	36
2.1.10	Versuchstiere	37
2.2	Methoden	37
2.2.1	Tierhaltung	37

2.2.2	Herstellung G-CSF defizienter Mäuse	38
2.2.3	Zucht der G-CSF defizienten Mäuse	39
2.2.4	Versuchsaufbau	41
2.2.5	Mausmodell	42
2.2.5.1	Infarktinduzierung	42
2.2.5.2	Gabe von Parathormon	44
2.2.5.3	Hämodynamik.....	45
2.2.5.3.1	Funktionsweise des Millar-Tip-Katheters	45
2.2.5.3.2	Parallele Conductance (Parallele Leitfähigkeit)	46
2.2.5.3.3	Versuchsablauf	47
2.2.5.3.4	Aufzeichnung und Messparameter	48
2.2.6	Histologie.....	49
2.2.6.1	Färbungen	49
2.2.6.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	49
2.2.6.1.2	Masson-Goldner-Trichromfärbung.....	49
2.2.6.2	Morphologische Untersuchungen.....	49
2.2.6.2.1	Infarktgröße	50
2.2.6.2.2	Wanddicke im Infarktgebiet.....	51
2.2.6.3	Immunhistochemische Untersuchungen	51
2.2.6.3.1	Neovaskularisation (PECAM-1/CD31)	51
2.2.6.3.2	Apoptose (TUNEL)	51
2.2.7	Durchflusszytometrie.....	52
2.2.7.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	52
2.2.7.2	Aufbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie	53
2.2.8	Enzyme-linked-immunoassay (ELISA)	55
2.2.9	Statistische Analyse	56
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Einfluss der G-CSF Defizienz auf die Mobilisation und das Homing verschiedener Stammzellpopulationen unter PTH-Behandlung.....	57
3.1.1	Die Mobilisierung von Knochenmarkstammzellen in das periphere Blut durch PTH Behandlung ist G-CSF vermittelt.....	58
3.1.2	Die Migration von BMCs aus dem peripheren Blut ins ischämische Myokard nach PTH-Behandlung bleibt bei der G-CSF Defizienz erhalten	60
3.2	PTH Behandlung erhöht den Anteil an Homingfaktoren im Herzen unabhängig vom endogenen G-CSF	63
3.3	Histologie.....	65

3.3.1	PTH-Behandlung verbessert das Remodeling auch in G-CSF defizienten Tieren.....	65
3.3.1.1	Infarktgröße	65
3.3.1.2	Linksventrikuläre Wanddicke.....	66
3.3.2	Endogenes G-CSF hat keinen Einfluss auf die vermehrte Neovaskularisation nach PTH-Behandlung	70
3.3.3	PTH-Behandlung hat auch in G-CSF defizienten Tieren einen positiven Effekt auf die Apoptose nach Myokardinfarkt.....	72
3.4	Hämodynamik	74
3.4.1	Ejektionsfraktion.....	76
3.4.2	Herzminutenvolumen	77
3.4.3	Maximaler linksventrikulärer Druck	78
3.5	Überleben	79
4	DISKUSSION	80
4.1	Bei G-CSF defizienten Mäusen findet nach PTH-Gabe keine Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark statt	81
4.2	Das verbesserte Homing von Stammzellen nach PTH Gabe bleibt auch bei G-CSF Defizienz erhalten	82
4.3	Die positiven Effekte von PTH auf die Neovaskularisation und das Remodeling werden nicht von endogenem G-CSF beeinflusst	84
4.4	Bei den G-CSF defizienten Tieren zeigte sich im Vergleich mit den Wildtyptieren eine vermehrte Anzahl an apoptotischen Kardiomyozyten	85
4.5	Die kardiale Funktion sowie das Überleben im Langzeitvergleich nach Myokardinfarkt wird nicht durch die G-CSF Defizienz beeinflusst.....	86
4.6	Limitationen der Arbeit.....	88
4.7	Parathormon als Therapieoption nach Myokardinfarkt – ein Ausblick.....	89
5	ZUSAMMENFASSUNG	91
6	LITERATURVERZEICHNIS	93
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	109

8	DANKSAGUNGEN	112
----------	---------------------------	------------

1 Einleitung

Der akute Myokardinfarkt und die chronische ischämische Herzkrankheit sind die häufigsten Todesursachen in Deutschland [1]. Mit einem Anteil von 12,8 % sind die ischämischen Herzerkrankungen auch weltweit die Haupttodesursache [2]. Durch die hohen Kosten, die durch die Therapie dieser Erkrankungen entstehen, ist die Weiterentwicklung der Therapie und der Prävention dieser Krankheit nicht nur von gesundheitspolitischen sondern auch von sozioökonomischem Interesse. Von insgesamt 254,3 Milliarden Euro Krankheitskosten wurden in der Bundesrepublik im Jahr 2008 37 Milliarden Euro für die Behandlung von Herz- und Kreislauferkrankungen ausgegeben. Die ischämischen Herzerkrankungen fielen hierbei mit ungefähr 6,2 Milliarden Euro ins Gewicht [3].

Essentiell bei der Therapie des akuten Myokardinfarkts ist eine möglichst schnelle Revaskularisierung des Gefäßes, entweder chirurgisch oder interventionell mittels einer perkutanen Koronarintervention (PCI), um das Ausmaß des Gewebeschadens und somit der Infarktgröße zu vermindern [4, 5]. Durch die Akuttherapie und die intensive Postinfarkttherapie mit ACE-Hemmern [6-8], Diuretika [9], β -Blockern [10-12], Aldosteronantagonisten [13-15] und Statinen [16-18] hat sich das Überleben nach Myokardinfarkt in den letzten Jahren stark verbessert. Nichtsdestotrotz zielen die konventionellen Therapieansätze der ischämischen Kardiomyopathie nur auf eine Verlangsamung der Krankheitsprogression ab, nicht aber auf die kausale Ursache, nämlich den Untergang von Kardiomyozyten. So kann es im Verlauf zu einem weiteren Fortschreiten der ischämischen Kardiomyopathie kommen. Ultima ratio ist hier dann nur noch die Herztransplantation, doch besteht aufgrund des Organspendermangels eine deutliche Diskrepanz zwischen den durchgeführten Transplantationen (366 im Jahr 2011) und der Neuanmeldung für eine Herztransplantation (695 im Jahr 2011), sodass circa ein Drittel der Patienten auf der Warteliste für ein neues Herz verstirbt [19]. Nicht zuletzt aus medizinischem, ethischem und sozioökonomischem Interesse liegt ein großer Fokus auf der Erforschung neuer Therapieansätze für die Behandlung der ischämischen Kardiomyopathie. Die Stammzelltherapie stellt hierbei ein äußerst vielversprechendes Forschungsgebiet dar.

Seit einigen Jahren haben sich die Knochenmarkstammzellen (BMC) als ein neuer Ansatz für die Therapie des Herzinfarktes herauskristallisiert [20, 21]. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an zirkulierenden BMCs ein unabhängiger positiver Prädiktor für das Outcome

von Herz-Kreislaufkrankungen ist [22]. Verschiedene Zytokine, besonders der Granulozyten-stimulierende Faktor (G-CSF), sind potente Stimulatoren für die Mobilisation von BMCs in das periphere Blut. Zwar zeigten vorklinische Studien positive Effekte von G-CSF auf die Hämodynamik, Remodeling und das Überleben nach Myokardinfarkt [23], jedoch konnten diese Effekte in klinischen Studien nicht bestätigt werden [24, 25]. Ein möglicher Grund könnte das verschlechterte Homing von zirkulierenden Stammzellen unter G-CSF-Therapie sein [26]. Hierbei resultiert die G-CSF-vermittelte Spaltung des CXCR-4-Rezeptors und die Inaktivierung von SDF-1 in einer verminderten Chemotaxis dieser Zellen in das ischämische Myokard [27, 28].

Eine weitere Substanz, die eine Stammzellmobilisation aus dem Knochenmark vermittelt, ist das Parathormon, ein Hormon welches vor allem die Homöostase von Calcium und Phosphat beeinflusst [29], aber auch einen Effekt auf die Stammzellnische im Knochenmark hat [30]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Patienten mit primären Hyperparathyreoidismus eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden BMCs im peripheren Blut aufwiesen [31]. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass eine PTH-Behandlung nach Myokardinfarkt zu einer Verbesserung der ischämischen Kardiomyopathie führte [32, 33]. Diese Effekte waren mit einer vermehrten Anzahl von zirkulierenden BMCs und einem verbesserten Homing dieser Zellen in das ischämische Myokard assoziiert [34]. Die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark mittels PTH basierte auf einer Aktivierung von Osteoblasten im Knochenmark. Diese Aktivierung führt zu einem verbesserten Überleben sowie verbesserter Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen und zu einer Sekretion von verschiedenen Zytokinen, unter anderem auch G-CSF [35, 36]. Wir konnten des Weiteren zeigen, dass gesunde Mäuse, die mit PTH behandelt wurden, nicht nur eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden BMCs hatten, sondern auch ein erhöhtes Serumlevel an G-CSF. Eine pharmakologische Blockade von G-CSF führte zu einer signifikanten Verminderung der mobilisierenden Wirkung von PTH [32].

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist es noch nicht geklärt, in welchem Maße diese G-CSF abhängige Mobilisation von Stammzellen die positiven Effekte von PTH nach einem Myokardinfarkt beeinflusst. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die kardioprotektiven Effekte von PTH in einem transgenen G-CSF defizienten Mausmodell untersucht.

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarktes

Bei einem Myokardinfarkt entsteht durch Minderversorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff eine Myokardnekrose. Ursache des akuten Myokardinfarkts ist hauptsächlich die Ruptur arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen in den Herzkranzgefäßen. Das Auftreten dieser Ablagerungen (Plaque) in den Gefäßwänden beginnt schon im Kindesalter [37] und wird durch die so genannten kardiovaskulären Risikofaktoren begünstigt. Zu diesen Risikofaktoren gehören besonders Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Rauchen, Diabetes mellitus und eine familiäre Prädisposition [38].

Die Entstehung der Plaques beginnt mit Veränderungen an den Endothelzellen. Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass unter lipidreicher Diät Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1 [39]) auf den Endothelzellen exprimiert werden und Leukozyten in die Gefäßwand migrieren [40]. Parallel hierzu kommt es zur Aufnahme von LDL-Molekülen in die Gefäßwand [41]. Die in die Gefäßwand migrierten Monozyten differenzieren zu Gewebsmakrophagen und phagozytieren die Lipoproteine. Bei diesem Vorgang spielen „scavenger“-Rezeptoren eine große Rolle, über die die Makrophagen die oxidierten Lipoproteine aufnehmen. Man nennt diese Zellen dann aufgrund ihres Aussehens im Lichtmikroskop „Schaumzellen“. Durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (vor allem $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1) wachsen glatte Muskelzellen in die Gefäßwand ein, welche Kollagen und Elastin produzieren und so eine fibröse Kappe über den Lipidablagerungen bilden [42].

Die Pathogenität der Plaques wird maßgeblich durch einen hohen Anteil an Lipidablagerungen, einer dünnen fibrösen Kappe, einer hohen Anzahl an Makrophagen sowie einer geringen Anzahl an glatten Muskelzellen beeinflusst [43-45]. Eine Plaque, die die beschriebenen Charakteristika aufweist, wird als vulnerable Plaque bezeichnet. Die Mechanismen, die von einer stabilen Plaque zu einer vulnerablen Plaque führen, sind von zentralem Interesse der Arterioskleroseforschung.

Bekannt ist, dass oxidiertes LDL und Gewebsmakrophagen, die bestimmte Zytokine ausscheiden ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1 α , IL-1 β), die Expression von MMP-9 fördern. MMP-9 degradiert die extrazelluläre Matrix in der fibrösen Kappe, destabilisiert so die Plaque und macht sie anfällig für eine Ruptur [46]. Zu einem weiteren Stabilitätsverlust kommt es durch einen

Verlust von glatten Muskelzellen durch Apoptose [47]. Zur endgültigen Ruptur einer Plaque kommt es letztendlich durch ein Ungleichgewicht zwischen der Belastung der Plaque in der Systole und der Plaquestabilität. Bei den gefährlichen lipidreichen Plaques wird die gesamte Belastung auf die Grenzgebiete der fibrösen Kappe geleitet, was die Belastung an diesen Stellen verstärkt [48]. Kommt es nun zu einer Ruptur der Plaque treten stark prokoagulatorisch wirkende Stoffe aus, beispielsweise Thromboplastin [49]. Hierdurch wird die Gerinnungskaskade aktiviert, was zur Entstehung eines Thrombus führt, der das Lumen der Koronararterie verlegen kann [50]. Das Myokard, welches von dem verlegten Gefäß versorgt wird, kann infolgedessen nicht mehr mit Blut versorgt werden, wodurch ein Myokardinfarkt entsteht.

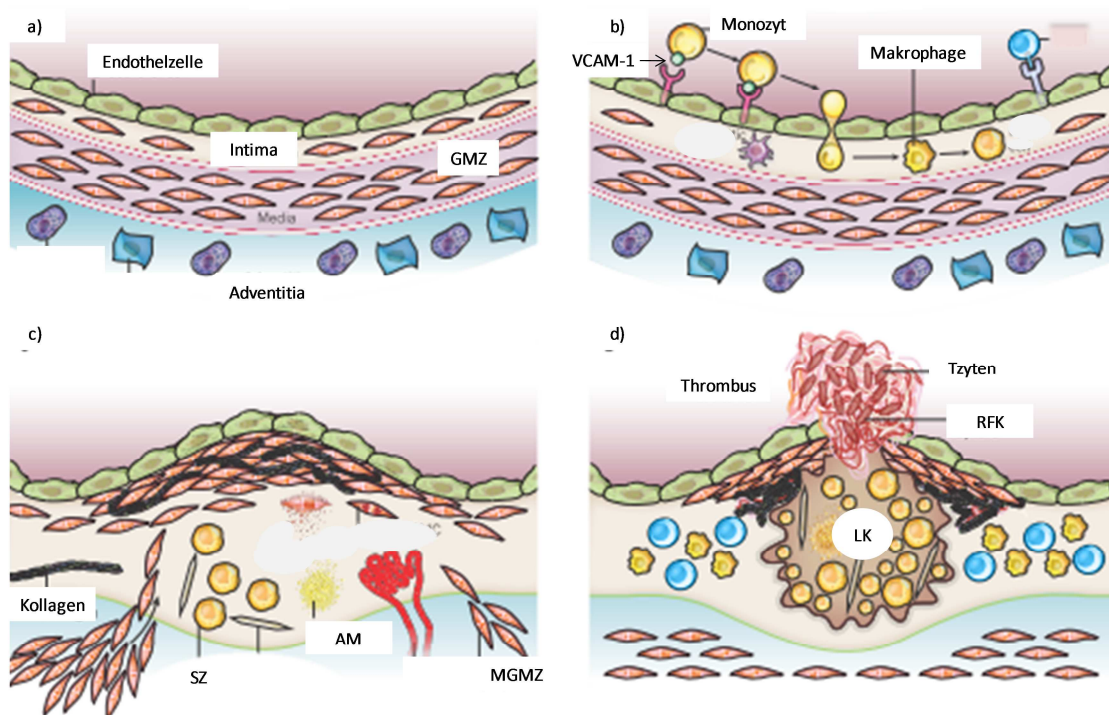


Abbildung 1

Entstehung einer Plaqueruptur modifiziert nach [42]: **a)** Normale Gefäßwandgliederung in Intima, Media und Adventitia; **b)** Adhäsion und Migration von Monozyten und Differenzierung in Gewebsmakrophagen; **c)** Entstehung von Schaumzellen und Einwanderung von glatten Muskelzellen, Bildung einer fibrösen Kappe; **d)** Plaqueruptur und Bildung eines Thrombus; GMZ: Glatte Muskelzelle; SZ: Schaumzelle; AM: Apoptotischer Makrophage; MGMZ: Migrierende glatte Muskelzelle; LK: Lipidkern; RFK: Rupturierte fibröse Kappe; Tzyten: Thrombozyten

1.1.2 Pathophysiologische Veränderung des Herzens nach Myokardinfarkt

Um den Zelluntergang nach einem akuten Myokardinfarkt zu kompensieren, werden zahlreiche Mechanismen, sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene aktiviert, die

die Form, Funktion und Struktur des Herzens verändern. Diese Vorgänge, welche Ventrikeldilatation, Hypertrophie, Narbenbildung und neurohumorale Anpassungsreaktionen umfassen, werden als Remodeling zusammengefasst [51]. Hierbei kann eine Frühphase (bis zum 3. Tage) von einer Spätphase (ab dem 3. Tage) des Remodelings unterschieden werden, wobei in der Frühphase eher die Infarkt- und Periinfarktzone und in der Spätphase der gesamte linke Ventrikel betroffen ist [52]. Das Ausmaß des Remodelings wird vor allem durch das initiale Perfusionsdefizit bestimmt [53].

Während der Frühphase des Remodelings verursachen proinflammatorische Mediatoren, die von den geschädigten Myozyten freigesetzt werden, eine Entzündungsreaktion, die essenziell für die Infarktheilung ist [54]. Die Einwanderung von Monozyten, welche letztlich zu Gewebsmakrophagen differenzieren und nekrotische Zellen abbauen, ist hierbei von größter Bedeutung.

Durch die fortschreitende Entzündungsreaktion kann es zu einer Infarktausdehnung kommen. Hierbei handelt es sich nicht um eine voranschreitende Myokardnekrose, sondern eher um ein Auseinandergleiten von Myozyten aufgrund des Abbaus von interzellulärem Bindegewebe durch MMP-9, das von neutrophilen Granulozyten produziert wird [55, 56]. Das Ausmaß der Infarktausdehnung steht in enger Beziehung zur Prognose der Erkrankung [57].

In der Spätphase des Remodelings versucht das Herz die eingebüßte Funktion des Ventrikels auszugleichen. Dies führt zu einer Dilatation und Hypertrophie des linken Ventrikels [58] und so - im Rahmen des Frank-Starling-Mechanismus - zu einer Vergrößerung des Schlagvolumens und einer Verbesserung der Kontraktilität [53]. Initial kann hierdurch die Funktion des linken Ventrikels aufrecht erhalten werden, doch kommt es im weiteren Verlauf zu einem Fortschreiten der Dilatation und Myokardhypertrophie, was zu einer systolischen Dysfunktion, Myokardfibrose (und somit zu Relaxationsstörungen) und aufgrund des Missverhältnisses zwischen Myokardmasse und Durchblutung zur Apoptose und Nekrose von Myozyten führt [59, 60]. Dieser Zelluntergang wird durch das RAAS- und das sympathoadrenerge System unterstützt, die durch ihre positiven ino- und chronotropen Effekte den myokardialen Sauerstoffverbrauch steigern und somit das Perfusionsmissverhältnis weiter verstärken [61]. So kommt es durch das Remodeling, das im Akutstadium des Myokardinfarkts lebenswichtig ist, zu einem Circulus vitiosus und einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz.

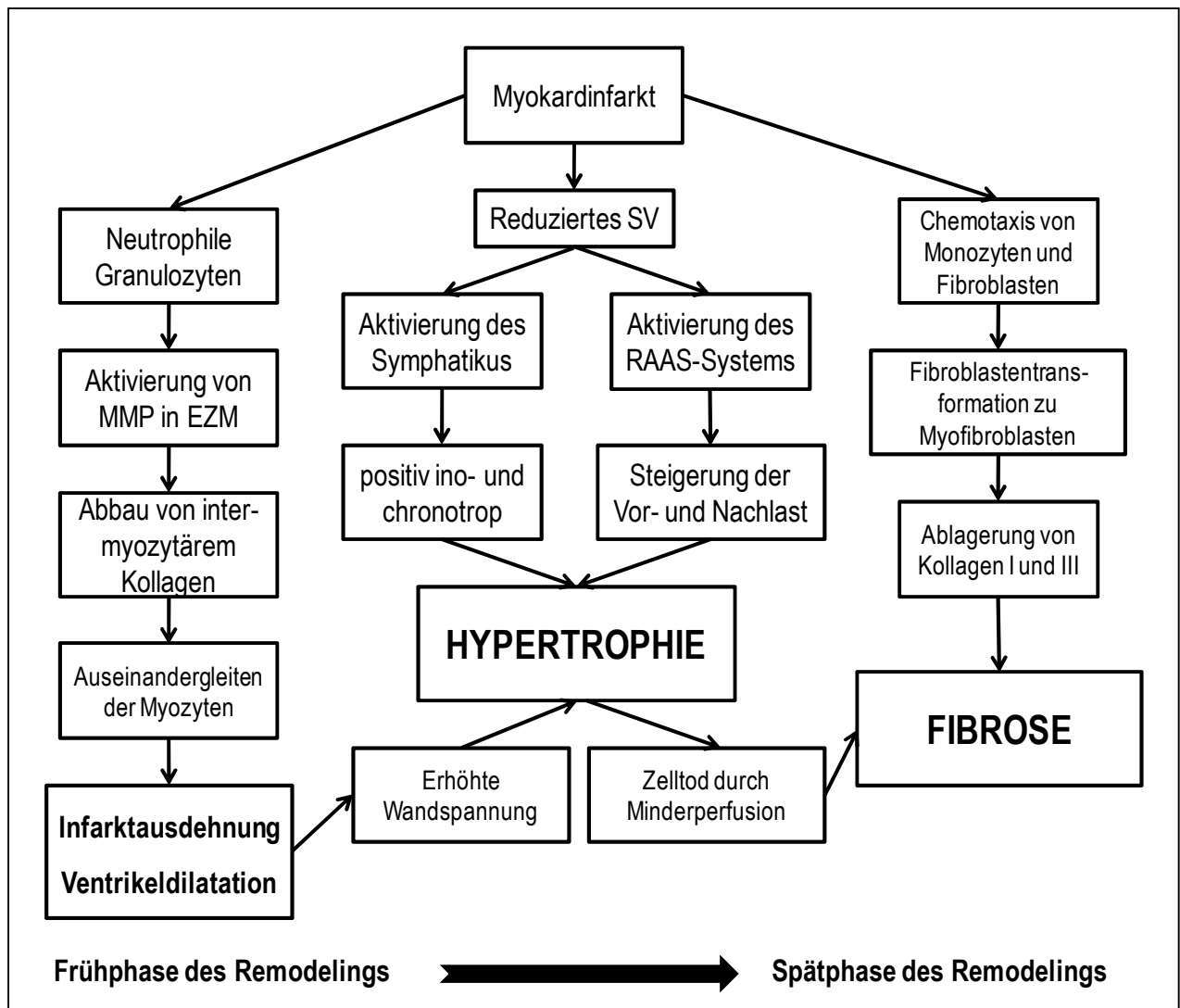


Abbildung 2

Schematische Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge beim Remodeling; MMP: Matrixmetalloproteasen; EZM: Extrazelluläre Matrix SV: Schlagvolumen; RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; modifiziert nach [62]

1.2 Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt

Die regenerativen Fähigkeiten des Körpers begeistern die Menschen schon seit dem frühen Griechenland. In der Prometheus-Sage wird beschrieben wie ein Teil von Prometheus' Leber, als Strafe für den Diebstahl des Feuers aus dem Olymp, vom Adler Ethon herausgepickt wird, welcher sich dann über Nacht wieder regeneriert, nur um am nächsten Tag wieder von dem Adler gefressen zu werden. Tatsächlich ist die Leber eines der Organe mit der höchsten Regenerationsfähigkeit [63].

Im Gegensatz zur früheren Meinung, dass ein Zelluntergang im Herzen nur durch Hypertrophie ausgeglichen werden kann, ist das menschliche Herz sehr wohl regenerationsfähig. Jedoch ist diese nicht ausreichend, um einen relevanten Gewebsuntergang zu regenerieren [64]. In einer Studie, die sich die Atombombentests während des Kalten Krieges und den hierbei entstandenen Einbau von ^{14}C in das Genom zu Nutzen macht, konnte gezeigt werden, dass im Laufe eines Menschenlebens ungefähr 50% der Kardiomyozyten erneuert werden [65]. Bei verschiedenen niederen Vertebraten, beispielsweise Zebrafische oder Molche, konnten bestimmte Untergruppen von Herzmuskelzellen nachgewiesen werden, die eine deutlich stärkere Regenerationsfähigkeit zeigen, sodass sogar ein relevanter Myokardschaden regeneriert werden kann [66, 67]. In einer weiteren Studie mit induzierbaren kardiomyozytenspezifischen transgenen MerCreMer-Mäusen, bei der nach Zugabe von Tamoxifen Kardiomyozyten irreversibel mit GFP markiert wurden, konnte gezeigt werden, dass auch nach einer myokardialen Ischämie ungefähr 15 % der Kardiomyozyten der Infarktgrenzzone keine Fluoreszenz zeigten.

In diversen präklinischen und klinischen Studien der letzten Jahre wurden verschiedene Populationen von Stammzellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Regeneration von Herzmuskelzellen untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei Skelettmyoblasten [68, 69], adulte Stammzellen [70-73], residente kardiale Stammzellen [74, 75], embryonale Stammzellen [76-80] und induzierte pluripotente Stammzellen [81-83].

1.2.1 Arten von Stammzellen

Als Stammzellen werden unreife Zellen bezeichnet, die zu unbegrenzter Selbsterneuerung fähig sind und sich mit zunehmendem ontogenetischem Alter in die verschiedenen Arten von Zellen ausdifferenzieren können. Jede Stammzelle kann sich bei einer Zellteilung entweder

wiederum in eine Stammzelle entwickeln oder sich weiter ausdifferenzieren. Heute sind in der Stammzelltherapie vor allem pluripotente Stammzellen und adulte multipotente Stammzellen von besonderer Bedeutung [84]. Pluripotente Stammzellen sind in der Lage, sich in Zellarten aller drei Keimblätter und Keimbahnzellen zu differenzieren. Adulte Stammzellen, die schon weiter ausdifferenziert sind und sich deshalb nur noch in Zellen ihres Gewebetyps ausdifferenzieren können heißen multipotente Stammzellen. Im Rahmen dieses Kapitels soll auf die Vor- und Nachteile dieser beiden Stammzellarten bezüglich der Stammzelltherapie näher eingegangen werden.

1.2.1.1 Pluripotente Stammzellen

Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen, die bezüglich ihres Differenzierungsverhaltens pluripotent sind. Von besonderem Interesse sind die seit längerem bekannten und gut untersuchten embryonalen Stammzellen [85] und die erst kürzlich erforschten induzierten pluripotenten Stammzellen [86]

1.2.1.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen wurden erstmals 1981 aus einem Mausembryo [87] und 1998 aus einem humanen Embryo [88] gewonnen. Nach der In-vitro-Befruchtung der Eizelle werden die ES-Zellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste entnommen und in Kultur gebracht. Aufgrund ihrer Pluripotenz können aus diesen embryonalen Stammzellen alle 210 Körperzellarten entstehen [89]. So konnte auch gezeigt werden, dass ES-Zellen zu rhythmisch kontrahierenden Kardiomyozyten differenzieren können [90] und dass sie in verschiedenen Tiermodellen nach Transplantation positive Effekte auf die Herzfunktion sowohl bei ischämischer als auch bei nicht-ischämischer Kardiomyopathie haben [77, 79, 91-93]. Neben den positiven Effekten bestehen aber auch Hindernisse, die die klinische Anwendung von embryonalen Stammzellen erschweren. Zu nennen sind hier unter anderem die Bildung von Teratomen [94, 95], Schwierigkeiten bei der Aufreinigung der Zellen [96, 97], die immunologischen Probleme, die mit einer Transplantation von fremdem Gewebe einhergehen [84] und die ethischen Probleme. Die ethische Komponente stellt besonders in Deutschland aufgrund des strikten deutschen Stammzellgesetzes eine große Barriere dar. Gemäß eines Bundestagsbeschlusses vom 11. April 2008 wurde dieses Gesetz zwar gelockert, sodass nun embryonale Zellen, die bis zum Stichtag 1. Mai 2007 entnommen wurden, nach Deutschland importiert werden dürfen. Im internationalen Vergleich sind diese Regelungen jedoch immer

noch sehr streng. Mit der Einführung der induzierten pluripotenten Stammzellen wurde sowohl eine Lösung für die ethische als auch für die immunologische Problematik gefunden.

1.2.1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

Mit der Reprogrammierung von bereits differenzierten Zellen in einen pluripotenten Zustand sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen schafften Yamanaka et al. einen Durchbruch auf dem Gebiet der Stammzellforschung [86, 98]. Durch die Einbringung von vier Genen (c-Myc, Klf-4, Oct-4 und Sox-2) war es ihnen möglich, aus adulten Fibroblasten Zellen zu generieren, die sich bezüglich der Morphologie und der Wachstumseigenschaften wie ES-Zellen verhielten und auch ES-Zellmarker-Gene exprimierten. Bei der Transplantation dieser Zellen in das subkutane Gewebe von Nacktmäusen zeigte sich eine Tumorentstehung, die aus Zellen aller drei verschiedenen Keimblätter bestand [98]. Entscheidender Vorteil der iPS-Zellen im Rahmen der regenerativen Medizin ist die patientenspezifische Herstellung von genetisch identischen Zellen, weshalb im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen keine Abstoßungsreaktion hervorgerufen wird und auf eine Immunsuppression verzichtet werden kann [84].

Yamanaka et al. benutzten zur Einbringung der Stammzellfaktoren einen viralen Vektor, was für einen klinischen Ansatz aufgrund der Karzinogenität ein grundlegendes Problem darstellte [99]. Durch die direkte Einbringung von reprogrammierenden Proteinen ohne DNA-Vektoren konnte dieses Problem gelöst werden [100].

Aufgrund der oben genannten Probleme wie zum Beispiel der Aufreinigung der Zellen oder der Teratombildung müssen noch einige Hürden überwunden werden, um klinische Studien über pluripotente Stammzellen zu ermöglichen [84].

1.2.1.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen in ihrem Differenzierungspotential und ihrer Selbsterneuerungsfähigkeit deutlich eingeschränkt [69] und werden als multipotent beschrieben. Eine Differenzierung über die Grenzen des Keimblattes hinweg ist nicht mehr möglich. Wegen des fehlenden Risikos der Teratombildung, der unproblematischen Ethik und der einfachen Gewinnung, zum Beispiel

aus dem Knochenmark oder der Blutbahn, bieten die adulten Stammzellen deutliche Vorteile in der klinischen Anwendbarkeit.

Adulte Stammzellen kommen in vielen Geweben, wie zum Beispiel in der Leber, der Nabelschnur und vor allem dem Knochenmark vor. Zu ihnen zählen die Nabelschnurstammzellen, Knochenmarksstammzellen, mesenchymale Stammzellen, multipotente Progenitorzellen, hämatopoetische Stammzellen und kardial residente Stammzellen [101]. Diese Stammzellen benötigen eine bestimmte Umgebung, um ihren Stammzellcharakter aufrecht zu erhalten, welche erstmals von Schofield et al. als die sogenannte „Stammzellnische“ bezeichnet wurde [102, 103]. Diese Stammzellnische wird im Knochenmark hauptsächlich durch Osteoblasten, Stromazellen, Fibroblasten und vaskulären Zellen gebildet [104, 105]. Man kann grundsätzlich zwischen einer endostealen und einer perivaskulären Nische unterscheiden, wobei die hypoxische Umgebung der endostealen Nische die beste Voraussetzung für die ruhenden Stammzellen und die perivaskuläre Nische mit einer höheren Konzentration an Sauerstoff und Wachstumsfaktoren am besten für die Differenzierung der Stammzellen geeignet ist [106]. In diesen Nischen entscheiden verschiedene Faktoren (z.B. TGF- β , SDF-1), Zell-Zell-Interaktionen (z.B. Notch) und die extrazelluläre Matrix über das Schicksal der Stammzelle [107]. Besonders die Osteoblasten nehmen bei der Stammzellaktivierung eine wichtige Stellung ein, da sie durch Stimulierung ihres PTH/PTHrP-Rezeptors eine erhöhte Menge des Notch-Liganden Jagged1 produzieren, was zu einer Aktivierung von Notch und somit den ruhenden Stammzellen führt [30].

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die hämatopoetischen Stammzellen und die endothelialen Progenitorzellen untersucht, die sich unter anderem durch die Oberflächenmarker CD45, CD34, CD31 und CXCR4 auszeichnen. In nachfolgender Tabelle werden die wichtigsten adulten Stammzellen mit ihren Oberflächenmarkern und ihrer Quelle dargestellt.

Quelle	Zelltyp	Oberflächenmarker
Knochenmark	Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	CD34 ⁺ , CD45 ⁺ , CD133 ⁺ , c-kit ⁺ , Sca-1 ⁺ , Lin ⁻ , CXCR4 ⁺ [21]
Knochenmark	Mesenchymale Stammzellen (MSC)	CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺ , Str-1 ⁺ , CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , CD133 ⁻ [108]
Knochenmark	Multipotente adulte Stammzellen (MAPC)	Subtyp der MSC, CD45 ⁻ , Glykophorin A [109]
Knochenmark	Very small embryonic-like stem cells (VSEL-SC)	CXCR4 ⁺ , SSEA-1 ⁺ , Oct-4 ⁺ , Nanog ⁺ , Nkx2.5/Csx ⁺ , VE-cadherin ⁺ , GFAP [110]
Nabelschnurblut	Umbilikale somatische Stammzellen (USSC)	Subtyp der MSC; u.a. CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , c-kit ⁻ [111]
Peripheres Blut	Endotheliale Progenitorzellen (EPC)	Isolation aus mononukleären Zellen, CD34 ⁺ , CD31 ⁺ , CD45 ⁺ , KDR ⁺ [112]
Skelettmuskel	Gewebsständige Skelettmyoblasten (SM)	CD56 ⁺ ; Isolation aus Skelettmuskelbiopsien [68]
Herz	Residente kardiale Stammzellen (CSC)	CD45 ⁻ , CD34 ⁻ , c-kit ⁺ , Sca-1 ⁺ ; Isolation aus Herzmuskelbiopsien [74]
Maus-Hoden	Multipotent adult germline stem cells (maGSC)	Ras1 ⁺ , Grol1 ⁺ , Oct3/4 ⁺ , Nanog ⁺ , Utf1 ⁺ , Esg1 ⁺ , Rex1 ⁺ ; Proliferation und Differenzierung zu Kardiomyozyten [101]

Tabelle 1

Übersicht über die wichtigsten adulten Stammzellarten; modifiziert nach Engelmann

In den folgenden Kapiteln soll nun näher auf die verschiedenen Möglichkeiten und Ansätze der Stammzelltherapie mit adulten Stammzellen eingegangen werden.

1.2.2 Mechanismen der Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt

Orlic et al. beschrieben 2001 eine Transdifferenzierung von lin⁻c-kit⁺-Knochenmarkstammzellen zu Kardiomyozyten in vivo, was zur Verbesserung der Herzfunktion führte [113, 114]. In dieser Studie wurden lin⁻c-kit⁺-Zellen transgener EGFP-Mäuse kurz nach Ligation der LAD in das Randgebiet des Infarktes injiziert; nach 9 Tagen

zeigte sich, dass 68% des Infarktgebietes mit de novo synthetisierten Myozyten besiedelt waren. In darauffolgenden Studien wurde stark angezweifelt, ob eine Transdifferenzierung von Stammzellen in Kardiomyozyten tatsächlich stattfindet [64, 73]. Murry et al. zeigten in einem transgenen Mausmodell, bei dem Mäuse das Enzym β -Galaktosidase unter dem myozytenspezifischen α -MHC-Gen exprimierten, dass nach Transplantation von $c\text{-kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{lin}^-$ Zellen dieser transgenen Mäuse in Wildtyp-Mäuse in der 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galactosid-Färbung (XGal-Färbung) keine Zellen angefärbt wurden und somit auch keine Transdifferenzierung stattgefunden haben kann. Diese Ergebnisse wurden in einem ähnlichen EGFP-transgenen Modell bestätigt [73].

Immer mehr rücken parakrine Effekte der Stammzellen wie Verminderung der Apoptose, Verbesserung des Remodelings, Steigerung der Neoangiogenese und Aktivierung kardialer Stammzellen in den Mittelpunkt der Forschung [21, 64, 80, 115]. Yoon et al. konnten zeigen, dass nach Injektion von MSCs oder humanen knochenmarksstämmigen multipotenten Stammzellen (hBMSC) in ischämisches Myokard die Gewebskonzentration von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel VEGF, IGF-1, FGF und HGF, signifikant erhöht waren [116]. Die Theorie des parakrinen Mechanismus wurde in Studien unterstützt, die eine signifikante Verbesserung der Apoptose und Nekrose von isolierten Kardiomyozyten bei niedriger Sauerstoffkonzentration zeigten, wenn die Kardiomyozyten auf Medium gehalten wurden, das mit hypoxischen adulten Stammzellen konditioniert worden war [117, 118]. Injiziert man dieses Medium in vivo in das infarzierte Myokard, zeigte sich eine signifikant verbesserte Kapillardichte, eine Verminderung der fibrotischen Flächen und eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion [118]. In einer weiteren Studie von Gnechi et al. konnte gezeigt werden, dass verschiedene Faktoren (z.B. VEGF, FGF, HGF, Thymosin β 4), welche potentielle Mediatoren der positiven Effekte des konditionierten Mediums sind, von Akt-überexprimierenden MSCs als Reaktion auf Hypoxie sezerniert werden [119].

In nachfolgender Abbildung soll ein Überblick über die verschiedenen parakrinen Effekte adulter Stammzellen gegeben werden.

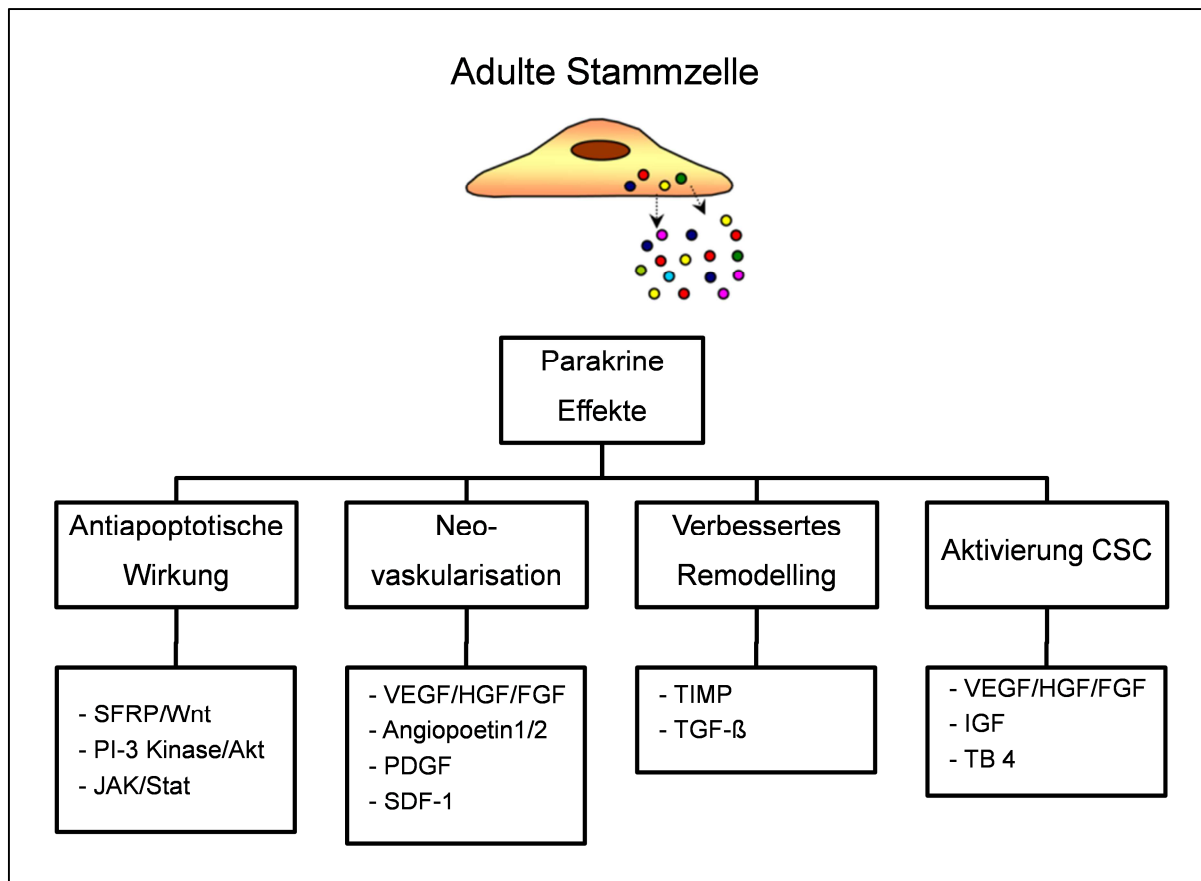


Abbildung 3

Verschiedene parakrine Effekte von adulten Stammzellen nach Myokardinfarkt (modifiziert nach [120]); CSC= kardiale residente Stammzellen; SFRP= secreted frizzles-related protein, Wnt=Wingless/Int-1; PI-3-Kinase= Phosphoinositid-3-Kinase; JAK= Januskinase; Stat= Signal Transducers and Activators of Transcription; VEGF= vascular endothelial growth factor, HGF= hepatocyte growth factor; FGF= fibroblast growth factor, PDGF= platelet derived growth factor, SDF-1: stromal cell-derived factor 1, TIMP= tissue inhibitor of metalloproteases, TGF- β = transforming growth factor beta, TB 4: Thymosin β 4

Die Komplexität der Vorgänge, an denen Stammzellen beteiligt sind, verlangt weitere Grundlagenforschung. Hierbei muss nicht nur der Wirkmechanismus der Stammzellen, sondern auch die für die Stammzellen schonendste Applikationsweise untersucht werden.

1.2.3 Applikationsweise der Stammzellen

1.2.3.1 Direkte Injektion von Stammzellen

Um Stammzellen an ihren Wirkort zu bringen, kann man sich verschiedener Methoden bedienen. Am weitesten verbreitet sind hier die intrakoronare [121-124], transepikardiale [125, 126] und die transendokardiale Applikationsweise [127]. Diese verschiedenen

Applikationsweisen haben alle ihre Vor- und Nachteile. Bei der intrakoronaren Injektion von Stammzellen können die Zellen zwar relativ einfach über einen Katheter in das gewünschte Gebiet injiziert werden, doch der Erfolg der Therapie ist abhängig von der Expression von Homingfaktoren, die die Migration der Zellen in das Myokard vermitteln [128]. Des Weiteren ist zu beachten, dass es bei der Applikation von großen oder ex vivo vermehrten Zellen zu Mikroembolisationen kommen kann [129, 130]. Um die Migration der applizierten Stammzellen zu verbessern, muss der Blutfluss durch eine repetitive Balloninflation unterbrochen werden. Der dadurch mögliche Endothelschaden ist ein weiterer Nachteil der intrakoronaren Applikation [131]. Die nötige Thorakotomie bei der transepikardialen Injektion von Stammzellen macht diese Methode für eine alleinige Therapie unbrauchbar [132]. Bei der katheterbasierten transendokardialen Injektion mit dreidimensionalem Mapping besteht das Problem in der Komplexität der Methode sowie dem Risiko der Perforation der Ventrikelwand [133].

Aufgrund der diversen Nachteile einer direkten Stammzellapplikation haben wir uns in unserer Arbeitsgruppe auf die endogene Stammzelltherapie spezialisiert.

1.2.3.2 Endogene Stammzelltherapie

Bei der endogenen Stammzelltherapie werden Stammzellen nicht durch externe Injektion in das Gefäßsystem oder das betroffene Gewebe eingebracht, sondern man bedient sich des endogenen Stammzell-Pools im Knochenmark. Durch verschiedene Agenzien werden ruhende Stammzellen aktiviert und aus dem Knochenmark in die Blutbahn mobilisiert. Durch das ischämische Geschehen werden Lockstoffe ausgeschüttet, die sogenannten Homingfaktoren, die die Migration der Stammzellen in das Gewebe vermitteln. Die migrierten Stammzellen können so, durch die unter 1.2.2 beschriebenen Mechanismen, positive Effekte auf die Neovaskularisation, Apoptose und das Remodeling herbeiführen.

Die einfache Anwendung, geringe Invasivität und das geringe Nebenwirkungsprofil machen diesen Ansatz der Stammzelltherapie für eine klinische Anwendung besonders attraktiv.

1.2.3.2.1 Mobilisation von Stammzellen

In einigen Studien konnte sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien gezeigt werden, dass der Körper auf einen ischämischen Reiz mit einer Ausschüttung von

endothelialen Progenitorzellen reagiert [134, 135]. Im ischämischen Hinterlaufmodell am Kaninchen zeigte sich durch die mobilisierten EPCs eine signifikant vermehrte Neovaskularisation, die sich durch eine Stimulation des Knochenmarks mit GM-CSF noch verbesserte [135]. Auch beim akuten Koronarsyndrom konnte eine Mobilisation von EPCs nachgewiesen werden, die mit einer Erhöhung des VEGF-Spiegels einherging [136]. Numaguchi et al. konnten in einer klinischen Studie zeigen, dass nicht alleine die Anzahl der mobilisierten EPCs, sondern auch ihre Differenzierungsfähigkeit in Endothelzellen eine signifikante Rolle bei der Verbesserung der kardialen Pumpfunktion spielt [137].

In einer klinischen Studie an Patienten mit koronarer Herzerkrankung konnten Werner et al. zeigen, dass die Häufigkeit des Auftretens eines kardiovaskulären Ereignisses, einer Revaskularisierung oder einer Rehospitalisation negativ mit der Anzahl der zirkulierenden EPCs korreliert [138]. In einer multivariaten Analyse, in der auch die gängigen kardiovaskulären Risikofaktoren miteinbezogen wurden, konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Anzahl an zirkulierenden EPCs ein unabhängiger Prädiktor für die schlechte Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen ist [139].

Neben der Häufigkeit des Auftretens von kardiovaskulären Krankheiten steht auch die Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren in negativer Korrelation zu den zirkulierenden EPCs. Es konnte gezeigt werden, dass Rauchen, die Konzentration von LDL im Serum, Diabetes, Bluthochdruck und eine positive Familienanamnese mit einer verminderten Anzahl und einer beeinträchtigten Funktion von EPCs vergesellschaftet war [138, 140, 141]. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung, dass sich die Anzahl an zirkulierenden EPCs durch Lebensstiländerungen wie zum Beispiel regelmäßigem körperlichem Training erhöhte [142].

Doch werden nicht nur EPCs nach einer myokardialen Ischämie aus dem Knochenmark mobilisiert. Sowohl die hämatopoetischen als auch die mesenchymalen Stammzellen werden nach Myokardinfarkt in das periphere Blut ausgeschüttet [143, 144]. Daher suchte man nach Möglichkeiten die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark zu verstärken.

In der Hämatoonkologie wird schon seit Anfang der Neunziger Jahre der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) benutzt, um die Mobilisation von Knochenmarksstammzellen in den Blutkreislauf zu steigern. Durch die erhöhte Konzentration

von Stammzellen im Blut wird so eine periphere Blutstammzellspende mittels Stammzellapherese möglich [145].

Die G-CSF-abhängige Stammzellmobilisation wird unter anderem durch die Unterbrechung der SDF-1/CXCR-4-Achse vermittelt [146]. Einerseits akkumuliert nach G-CSF-Gabe die neutrophile Elastase im Knochenmark, was eine Abspaltung des N-Terminus des CXCR4-Rezeptors und somit seinen Funktionsverlust zur Folge hat [147]. Andererseits wird durch G-CSF die Inaktivierung von SDF-1 durch die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV/ CD26) [148] und die Matrixmetalloprotease 9 (MMP-9) [149] verstärkt.

Durch die G-CSF-Gabe entsteht im Knochenmark eine hypoxische Stoffwechsellage, wodurch der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 stabilisiert wird. Dies löst eine vermehrte Transkription von VEGF-A im Knochenmark aus, wodurch eine Vasodilatation und eine Erhöhung der Permeabilität des Endothels verursacht wird [150].

Durch diese Mechanismen werden sowohl die Zell-Zell-Kontakte der knochenmarksständigen Stammzellen mit ihrer Umgebung unterbrochen als auch ein erleichterter Eintritt der Stammzellen in die Blutbahn erreicht [151].

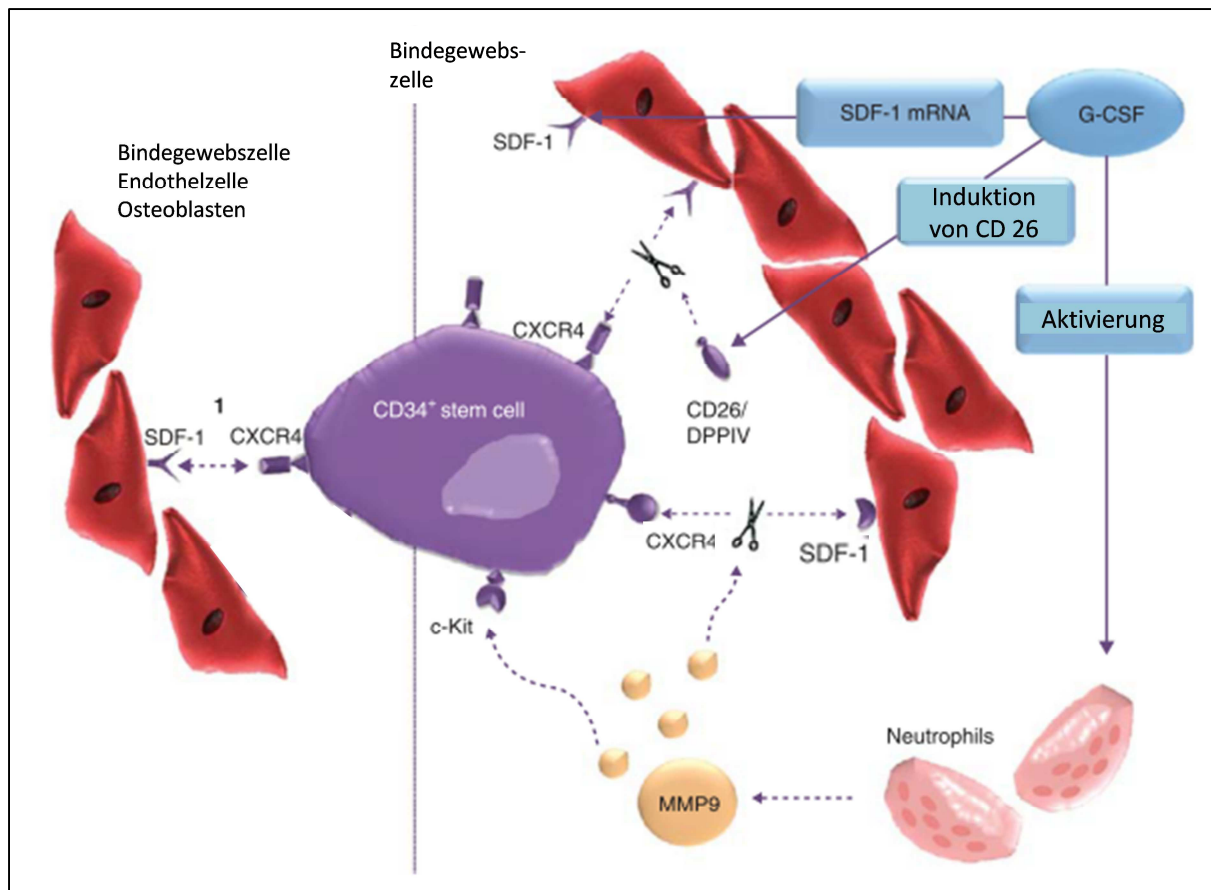


Abbildung 4

Übersicht über die mobilisierenden Wirkung von G-CSF (modifiziert nach [152])

Orlic et al. untersuchten erstmals die Gabe von G-CSF nach akutem Myokardinfarkt im Tiermodell. Die Mortalität der Tiere konnte durch die G-CSF-Gabe um 68% gesenkt werden, was vor allem an der 40%igen Verringerung der Größe der Infarktnarbe und einer signifikanten Verbesserung der Hämodynamik lag [153]. Auf Grundlage dieser und weiterer präklinischen Studien von kleinerem Umfang wurden klinische Studien eingeleitet [25, 154-157]. Diese Studien zeigten zwar eine Mobilisation von Knochenmarksstammzellen in das periphere Blut, brachten jedoch bezüglich der Wirksamkeit der Therapie eher ernüchternde Ergebnisse hervor [24, 25, 155, 156]. Dies könnte unter anderem auf die G-CSF vermittelte Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Achse und die somit verminderte Migrationsfähigkeit von Stammzellen aus dem peripheren Blut in das ischämische Gewebe zurückzuführen sein [27].

In der FIRSTLINE-AMI-Studie, die als eine der wenigen Studien eine signifikante Verbesserung der Ejektionsfraktion nach G-CSF-Gabe zeigte, erfolgte laut Protokoll die Gabe von G-CSF deutlich früher als bei den übrigen Studien (1,5 Stunden vs. 24-120 Stunden nach

Stentimplantation) [157]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass G-CSF über eine Aktivierung des Jak/Stat-Signalwegs eine verminderte Apoptose und eine verstärkte Neovaskularisation auch direkte Effekte auf das Überleben von Kardiomyozyten nach Herzinfarkt hat [158]. Dass das Ausmaß dieser Effekte abnimmt, je später die Applikation von G-CSF stattfindet, könnte eine Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse der klinischen Studien sein.

Aufgrund des negativen Einflusses von G-CSF auf das Homing von Stammzellen in das ischämische Gewebe wurde nach alternativen Möglichkeiten der Stammzellmobilisation gesucht. Eine Mobilisation konnte durch mehrere Agenzien wie z.B. Erythropoetin [159, 160], stem-cell derived factor (SCF) [161], VEGF [162], IL-8 [163] und Angiopoietin [164] erreicht werden, auf welche aber aus Gründen des Umfangs nicht weiter eingegangen werden kann.

Ein weiterer potenter Mobilisationsfaktor für Stammzellen ist das Parathormon. In einer klinischen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde bei Patienten mit Hyperparathyreoidismus eine erhöhte Anzahl an Knochenmarksstammzellen im peripheren Blut gefunden [31]. Brunner et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass neben einer signifikanten Mobilisation von BMCs durch PTH-Gabe auch der G-CSF-Level im peripheren Blut signifikant zunahm. Wurde G-CSF durch einen Antikörper blockiert, fehlte die mobilisierende Wirkung auf die Stammzellen von PTH [32]. Eine Mobilisation mit PTH führte jedoch im Gegensatz zu G-CSF nicht zu einer Depletion des Knochenmarks, was wahrscheinlich auf die stimulierende Wirkung von PTH auf die Osteoblasten und eine damit verbundene erhöhte Proliferation von Stammzellen zurückzuführen ist [30].

Auf die physiologischen Effekte von PTH als auch seine Effekte auf die Mobilisation und die Migration von Stammzellen soll in Kapitel 1.3 näher eingegangen werden.

Die Mobilisation von Stammzellen ist aber nur ein Teil der endogenen Stammzelltherapie. Um ihre positiven Effekte auf die Apoptose, Neovaskularisation und das Remodeling bewirken zu können, müssen Stammzellen aus dem Blutkreislauf in ihr Zielgebiet, in unserem Fall das ischämische Myokard, migrieren. Dieser Vorgang wird als Homing bezeichnet.

1.2.3.2.2 Homing von Stammzellen

Das Homing von Stammzellen aus dem Blutkreislauf in ein Zielgewebe beinhaltet verschiedene Teilschritte. Zunächst müssen die Endothelzellen der Gefäße die Stammzellen erkennen und diese binden; daraufhin transmigrieren die Stammzellen durch das Endothel und wandern in das Zielgewebe ein. An diesen Prozessen sind verschiedene Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle beteiligt [151]. Eine essentielle Rolle spielt hierbei die SDF-1/CXCR4-Achse.

Die SDF-1/CXCR4-Achse ist bereits sehr früh in der Entwicklung an Homingprozessen beteiligt. So konnte nachgewiesen werden, dass die Umverteilung der Hämatopoese von der Leber in das Knochenmark im zweiten Trimester der Schwangerschaft mit einer erhöhten Expression von SDF-1 im Knochenmark einhergeht, wodurch die hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark gelockt werden [152]. Im Erwachsenenalter ist die SDF-1/CXCR4-Achse an der Retention der Stammzellen im Knochenmark verantwortlich. Hierbei spielt die hypoxische Umgebung des Knochenmarks eine Rolle, da bei Hypoxie SDF-1 ständig exprimiert wird [165]. Ein gewisser Anteil der Stammzellen zirkuliert jedoch ständig im Blutkreislauf [151].

Kommt es zu einer Gewebshypoxie in einem peripheren Gewebe, wie es bei dem akuten Myokardinfarkt der Fall ist, wird dort die Expression von SDF-1 gesteigert. Es kommt zu einer Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark und einem Homing in das hypoxische Gewebe. Die vermehrte Expression von SDF-1 wird durch die Bindung des Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF-1) an den SDF-1-Promotor ausgelöst [166]. Blockiert man die SDF-1/CXCR4-Achse bleiben das Homing der Stammzellen und damit einhergehend auch die positiven Effekte der Stammzellen auf das ischämische Gewebe aus [166, 167].

Um diese Erkenntnisse therapeutisch zu nutzen, wurde durch verschiedene Ansätze versucht, die Expression von SDF-1 zu steigern. Askari et al. injizierten 8 Tage nach Myokardinfarkt SDF-1-überexprimierende Fibroblasten in das hypoxische Myokard und konnten zeigen, dass nach Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark mit G-CSF das Homing von CD34⁺ Zellen signifikant gesteigert und dadurch eine verbesserte Neovaskularisation und kardiale Funktion erreicht wurde [128].

Nachteil dieser Art der Anreicherung von SDF-1 ist die hohe Invasivität und die nötige gentechnische Veränderung von Zellen. Deshalb suchte man nach weiteren Möglichkeiten die SDF-1/CXCR4-Achse zu stabilisieren.

Wie bereits bekannt, ist die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV/CD26) für die Inaktivierung von SDF-1 durch Abspaltung des N-terminalen Restes verantwortlich [168]. Zaruba et al. konnten zeigen, dass durch genetische sowie pharmakologische CD26-Inhibition die Inaktivierung von SDF-1 unterbunden wurde. Im Infarktmodell wurde ein therapeutischer Ansatz untersucht, in dem die SDF-1/CXCR4-Achse durch die pharmakologische Inhibition von CD26 stabilisiert wurde und Stammzellen aus dem Knochenmark durch G-CSF mobilisiert wurden. Durch diese sogenannte „duale Stammzelltherapie“ konnte eine signifikante Verbesserung des Homings von Stammzellen erreicht werden, wodurch eine verbesserte Neovaskularisation, verminderte Apoptose, verbesserte myokardiale Funktion und ein verbessertes Überleben erreicht wurde [169].

Ein weiterer CD26-Inhibitor ist das Parathormon. Huber et. al konnten sowohl in vitro als auch in vivo nachweisen, dass eine PTH-Gabe die Aktivität von CD26 signifikant verringert. Hierdurch konnte die Konzentration von SDF-1 im Myokard signifikant gesteigert werden, was zu einem vermehrten Homing von CXCR4⁺-Stammzellen führte. Dies resultierte sowohl in einer verbesserten myokardialen Funktion als auch in einem verbesserten Überleben [34].

Sowohl aufgrund der mobilisierenden Wirkung als auch der positiven Effekte auf das Homing scheint Parathormon ein erfolgsversprechender Kandidat für die endogene Stammzelltherapie zu sein. In folgender Abbildung wird der Mechanismus der endogenen Stammzelltherapie nochmals vereinfacht dargestellt.

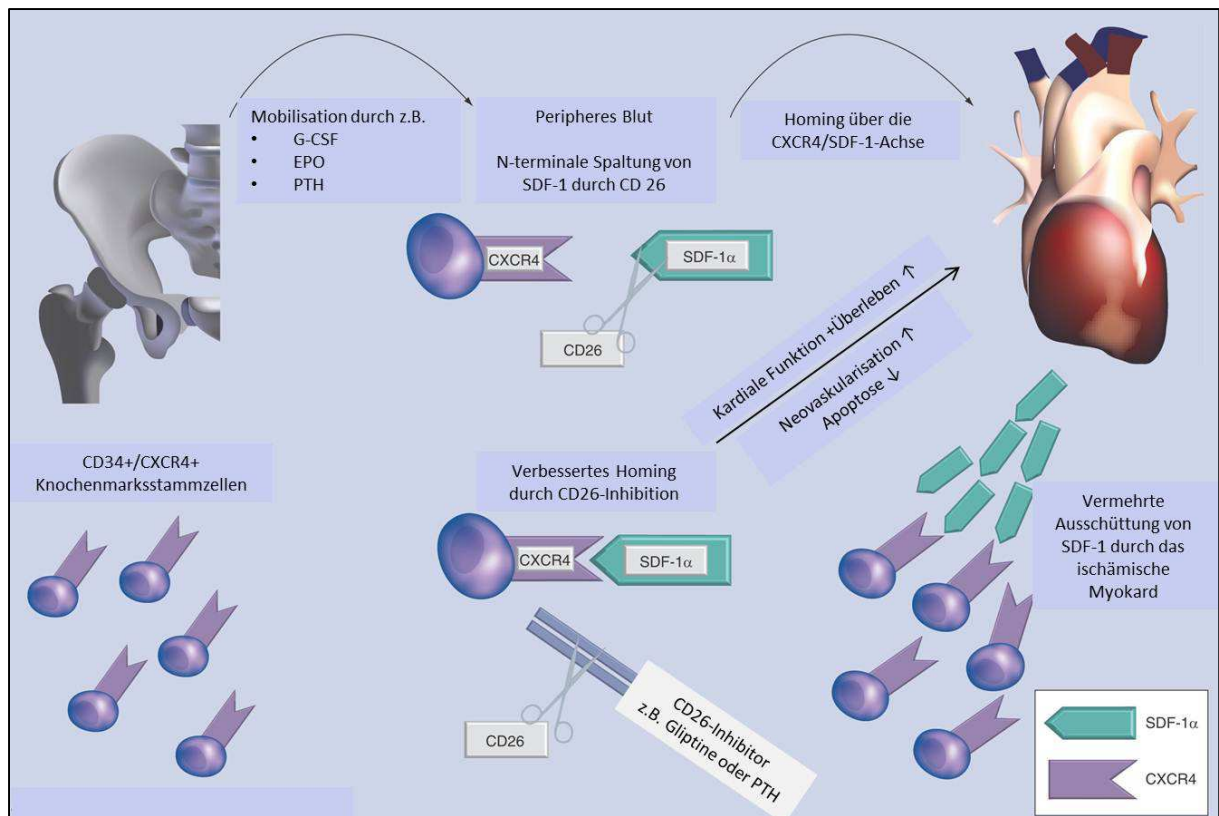


Abbildung 5

Übersicht über die endogene Stammzelltherapie (modifiziert nach [84])

1.3 Parathormon

Das Parathormon ist vor allem als ein Hormon bekannt, das bei der Homöostase des Kalziumspiegels im Blut eine maßgebliche Rolle spielt. Es wird in den Hauptzellen der Nebenschilddrüse gebildet und besteht aus 84 Aminosäuren [170], wobei für die Aktivierung der PTH-Rezeptoren nur das N-terminale 34 Aminosäuren-lange Ende des Parathormons eine Rolle spielt [171]. Die Ausschüttung von PTH wird in einem negativen Feedbackmechanismus reguliert, in welchem ein niedriger Kalziumspiegel im Blut (Hypokalzämie) die Ca^{2+} -sensitive Rezeptoren auf den Parathyreoidzellen aktiviert und somit über eine Aktivierung von G-Proteinen zu einer Sekretion von PTH führt [172]. Die Halbwertszeit von Parathormon im Blutkreislauf beträgt nur wenige Minuten [173].

Eine Steigerung des Kalziumspiegels im Blut erfolgt durch verschiedene Mechanismen. Einerseits steigert Parathormon die Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen über eine Aktivierung von Osteoklasten, andererseits wird sowohl die Resorption in der Niere als auch im Darm gesteigert. PTH wirkt auf direkte Weise auf den Knochen und die Niere, jedoch wird die Resorption im Darm nur indirekt über eine vermehrte Produktion von 1,25-Dicholecalciferol (Vitamin D3) gesteigert [170].

1.3.1 Wirkung auf das kardiovaskuläre System

1925 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen dem kardiovaskulären System und Parathormon hergestellt [174]. Nun, nach mehr als 80 Jahren Forschung, sind die verschiedenen Effekte von Parathormon immer noch nicht endgültig geklärt. Hier soll ein kurzer Überblick über die wichtigsten Erkenntnisse gegeben werden.

Will man die Wirkung von PTH auf das kardiovaskuläre System verstehen, muss man sowohl die Effekte von PTH auf das Gefäßsystem und auf den Herzmuskel unterscheiden als auch seine Effekte bei chronischer und intermittierender Applikation [175, 176].

Bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus tritt eine arterielle Hypertonie nahezu doppelt so oft auf als in der Kontrollgruppe [177]. Diese Erkenntnis steht in Einklang mit der hohen Prävalenz der linksventrikulären Hypertrophie bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus, wobei hier eine Korrelation zwischen linksventrikulärer Masse und

dem PTH-Spiegel besteht [178]. Parathormon löst durch eine Aktivierung der Proteinkinase C eine erhöhte Proteinsynthese aus [176].

Andererseits konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die hier auftretende arterielle Kalzifizierung bei niedrigen PTH-Spiegeln stärker ausgeprägt war als bei hohen PTH-Spiegeln [179]. Interessanterweise ist der PTH-Spiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz leicht erhöht, ohne dass ein Hyperparathyreoidismus besteht. Man könnte nun postulieren, dass der moderat erhöhte PTH-Spiegel ein Kompensationsmechanismus für die Herzinsuffizienz darstellt [180]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Dosierung von PTH essentiell für die Effekte ist. Eine hohe PTH-Dosis resultiert in einem Abbau von Ceramid, einem Second Messenger, der auch direkte Effekte auf die Kontraktion von glatten Muskelzellen besitzt. Im Gegensatz hierzu hat eine niedrige PTH-Dosis eine Erhöhung des Ceramid-Levels zur Folge [175]. Eine hohe PTH-Dosis führt so zur Kontraktion und eine niedrige PTH-Dosis zur Relaxation von glatten Muskelzellen.

Eine vasorelaxierende Wirkung konnte auch bei der intermittierenden Gabe von PTH festgestellt werden. Durch eine cAMP-abhängige Blockierung der L-Typ Kalziumkanäle, kommt es zu einer Verminderung des Kalziumeinstroms und so zu einer verminderten Kontraktion der glatten Muskelzellen [176]. Bei einem Infarktmodell am Hund führte die PTH-Gabe, nach einer ischämischen Phase von 30 Minuten, zu einem erhöhten myokardialen Blutfluss, einer Verbesserung der kardialen Funktion und verhinderte das Entstehen eines kardialen Schocks [181].

1.3.2 Einsatz von PTH in der endogenen Stammzelltherapie

Wie bereits oben beschrieben erbrachten die klinischen Stammzellstudien, die eine Mobilisation von Knochenmarksstammzellen mit G-CSF nach Myokardinfarkt untersuchten, ernüchternden Ergebnisse. Daher wurde nach weiteren Agenzien gesucht, um die Stammzelltherapie nach einem Myokardinfarkt zu verbessern.

PTH ermöglicht eine Stammzellmobilisation durch seine Wirkung auf die Stammzellnische im Knochenmark [30, 36, 182, 183]. Eine bedeutende Rolle in der Regulation dieser Stammzellnischen spielen die Osteoblasten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Osteoblasten durch eine Bindung von PTH an den PTH-Rezeptor 1 auf den Osteoblasten über die Adenylatcyclase die Proteinkinase A aktiviert [184]. Hierdurch wird der

Jagged1/Notch-Signalweg stimuliert, was zu einer Vermehrung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und einem verbesserten Überleben dieser Zellen nach einer Transplantation führt [30]. Durch eine Aktivierung der Osteoblasten wird die Ausschüttung von G-CSF vermehrt und somit die Mobilisation von Stammzellen verstärkt [35]. In einem transgenen Tiermodell, in dem die Osteoblasten durch die Gabe von Ganciclovir untergingen, zeigte sich bei Abwesenheit von Osteoblasten eine Verminderung der Anzahl der HSCs im Knochenmark. Wurde Ganciclovir abgesetzt erfolgte mit dem Wiederauftreten von Osteoblasten eine Repopularisierung des Knochenmarks mit HSCs [185]. Brunner et al. konnten an Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus eine vermehrte Anzahl von CD34 positiven Stammzellen im peripheren Blut nachweisen, die nach Parathyreoidektomie auf Normalwerte zurückfiel [31]. Im Mausmodell konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Mobilisation von Stammzellen mit PTH durch G-CSF vermittelt wird. Die Gabe eines G-CSF-Antikörpers verhinderte die Mobilisation der Stammzellen durch PTH in das periphere Blut [32]. Jedoch ging die Stammzellmobilisation von Parathormon, im Gegensatz zu der mit G-CSF, nicht mit einer Depletion des Knochenmarks einher [32]. In einer klinischen Studie über die Mobilisierung von Stammzellen für die autologe Stammzelltransplantation konnte gezeigt werden, dass bei circa 40 % der Patienten, bei denen eine vorherige Mobilisierung mit G-CSF fehlgeschlagen war, dennoch eine ausreichende Mobilisierung erreicht werden konnte, wenn PTH zur Therapie hinzugefügt wurde [186].

Auch die Migration der Stammzellen wird durch PTH beeinflusst. Zaruba et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass eine Behandlung mit PTH nach Myokardinfarkt das Homing von Stammzellen in das Myokard signifikant verbesserte [33]. Damit einhergehend verbesserte sich sowohl die Neovaskularisation, die myokardiale Funktion als auch das Überleben. In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe, welche die Behandlung von PTH und G-CSF miteinander verglich, wurde zwar bei beiden Agenzien eine Mobilisation von Stammzellen erreicht, jedoch zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Homings der Stammzellen in das ischämische Myokard nur bei der Behandlung mit PTH. Auch der untersuchte Perfusionsdefekt wurde nur bei der Behandlung mit PTH verbessert, wobei eine Kombination beider Stoffe keinen zusätzlichen Effekt hatte [187]. Der Unterschied im Migrationsverhalten der Stammzellen der beiden Therapieansätze kann durch den Einfluss erklärt werden, den sie auf die für das Homing wichtige SDF-1/CXCR4-Achse haben. PTH verbesserte das Homing von Stammzellen, indem es durch eine DPPIV-Inhibition SDF-1 stabilisiert wird [34]; im

Gegensatz hierzu resultiert eine G-CSF-Gabe in eine Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Achse durch Inaktivierung der beiden Bindungspartner [147, 148].

1.4 Fragestellung

Die begrenzten Therapiemöglichkeiten der ischämischen Kardiomyopathie verlangen nach neuen Therapieansätzen. Hierbei ist ein wichtiger innovativer Ansatz die Stammzelltherapie. Nach anfänglichen Erfolgen in präklinischen Studien, zeigten sich in klinischen Studien eher ernüchternde Ergebnisse. Weitere Grundlagenforschung ist nötig, um die Stammzelltherapie für den klinischen Ansatz zu ermöglichen.

Aufgrund der sowohl mobilisierenden Wirkung als auch der Steigerung des Homings von Stammzellen durch eine Stabilisierung der SDF-1/CXCR4-Achse stellt PTH ein erfolgsversprechendes Agens für die endogene Stammzelltherapie dar. In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, in welchem Maße die G-CSF-vermittelte Mobilisation eine Rolle für die kardioprotektiven Effekte nach PTH-Behandlung spielt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Wirkung von PTH nach Myokardinfarkt in einem transgenen G-CSF-defizienten Mausmodell untersucht.

Insbesondere sollen folgende Fragen geklärt werden:

- 1.) Bleibt die Mobilisation von Stammzellen nach PTH-Gabe bei G-CSF defizienten Mäusen erhalten?
- 2.) Welchen Einfluss hat die G-CSF Defizienz auf das Homing der Stammzellen in das ischämische Myokard?
- 3.) Welche Auswirkung hat die G-CSF Defizienz auf die parakrinen Effekte der PTH-Therapie?
- 4.) Werden die kardiale Funktion und das Überleben durch die G-CSF Defizienz beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in p.A.-Qualität (von höchstem Reinheitsgrad) bezogen.

Aqua ad injectabilia	B Braun, Melsungen
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Clenz-Lösung	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Ethanol 96%, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Plaque PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Formalin (Formaldehyd 4%)	Roth, Karlsruhe
H ₂ O dest.	Millipore, Billerica, USA
Isotone Natriumchloridlösung	B Braun, Melsungen
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sheath-Fluid	Beckman Coulter, Fullerton, USA

2.1.2 Antikörper

CD31 (PECAM-1, PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34 (FiTC, anti-mouse)	eBioscience, San Diego, USA
CD45 (LCA, PerCP, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
C-kit (CD117, PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CXCR4 (CD184, PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg

PE (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
PerCP (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
Sca-1 (PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin (PerCP)	BD Pharmingen, Heidelberg
Quantikine Mouse CXCL12/SDF-1 α)	R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstedt

2.1.3 Färbungen

Eosin	BD Pharmingen, Heidelberg
Hämatoxylin	BD Pharmingen, Heidelberg
Masson	BD Pharmingen, Heidelberg
Trichrom	BD Pharmingen, Heidelberg
Apoptag peroxidase in situ apoptosis detection kit	Millipore, Schwalbach

2.1.4 Pharmaka

Atipamezolhydrochlorid (Antisedan)	Pfizer, Berlin
Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic)	Essex Pharma, München
Dexpanthenol (Bepanthen Augensalbe)	Bayer, Leverkusen
Fentanylcitrat (Fentanyl-Janssen 0,5 mg)	Janssen-Cilag, Neuss
Flumazenil (Flumazenil DeltaSelect 0,1 mg/ml)	DeltaSelect, Dreieich
Heparin-Na 25000 iE	B Braun, Melsungen
PTH (1 – 34)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa 5%)	Inresa, Freiburg

Medetomidinhydrochlorid (Domitor)	Pfizer, Berlin
Midazolamhydrochlorid (Midazolam – ratiopharm 15 mg/3 ml)	Ratiopharm, Ulm
Nalaxonhydrochlorid (Naloxon Inresa 0,4 mg)	Inresa, Freiburg
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer, Leverkusen

2.1.5 Operationszubehör

Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Roche, Grenzach-Whylen
Braunol-Lösung	B Braun, Melsungen
Dreieckige Saugtupfer unsteril (SUGI)	Kettenbach Medical, Eschenburg
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibond excel, Prolene)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten; FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim
Durapore 1,25 cm x 9,1 mm	3M Health Care, Neuss
Elca Enthaarungscreme	Asid Bonz, Herrenberg
Feather disposable Scalpel No.11	Feather safety razor, Osaka, Japan
Infrarotlampe	Petra Electric, Burgau
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss, Jena
Microlance 3 Einmal-Injektions-Kanülen der Größe 21 G 0,8 mm x 40 mm und	Becton Dickinson, Heidelberg

30 G 0,3 mm x 13mm	
Mouse-Ventilator Minivent 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
OP-Mikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Jena
Spritzen zu 1 und 2 ml (BD plastipak)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen BD Micro-Fine+ 1ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilium	Bode Chemie, Heidelberg
Temperaturkontrollmodul TKM-0903-1280	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim
Untersuchungshandschuhe Peha – soft	Hartmann, Heidenheim
Wärmeplatte EHE-3505-CU-SWCR	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim
Zellstoff-Ecken (Zelletten)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf

2.1.6 Labor

Autoklav Varioklav Dampfsterilisation	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
BD Falcon Cell Strainer 70 µl	BD Biosciences, Bedford, USA
Chemikalienlöffel	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Cups 1,5 /2 ml	Eppendorf, Hamburg
FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL	Beckman Coulter, Fullerton, USA
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Flasche 500 ml	Schott Duran, Mainz
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Glaszylinder, 500 ml	Schott, Mainz

Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena
Petrischalen Steriplan	Roth, Karlsruhe
Pipetten 2,5/20/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Scout Pro	Ohaus, Giessen
Zentrifuge EBA 12R	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifügeröhrchen 15 ml/50 ml	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

2.1.7 Hämodynamik

Millar-Tip-Katheter (1.4 French)	Millar Instruments, Houston, USA
Millar Aria Pressure-Volume Konductance	Millar Instruments, Houston, USA System
Plugsys	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstettern

2.1.8 Histologie

Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena

2.1.9 Soft-und Hardware

Adobe Photoshop 7.0	Adobe, San Jose, USA
---------------------	----------------------

Axio Vision V4.3	Carl Zeiss, Jena
Dell Desktop PC Optiplex GX 260	Dell, Round Rock, USA
HSE Isoheart	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
MPCU2PV.exe	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PVAN 2.9	Millar Instruments, Houston, USA

2.1.10 Versuchstiere

Alle Versuche wurden an 8-12 Wochen alten männlichen Tieren des Stammes C57BL/6 mit einem Gewicht zwischen 20 bis 25 g durchgeführt.

Die Wildtypmäuse erhielten wir von Charles River (Sulzfeld).

Zwei Zuchtpaare, die bezüglich des G-CSF Gens heterozygot waren, wurden uns freundlicherweise von dem Labor von Prof. Erwin Wagner (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid) bereitgestellt. Die für die Versuche verwendeten Tiere waren alle homozygot bezüglich des G-CSF Gens und stammten aus eigener Zucht.

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierexperimente an der Maus entsprechend den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Die durchgeführten Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 55.2-1-54-2531-106-07).

2.2 Methoden

Alle Methoden wurden gemäß bestehenden laborinternen Protokollen durchgeführt.

2.2.1 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden jeweils zu zweit beziehungsweise zu dritt in einem Käfig mit Standardfutter und Wasser ad libitum gehalten. Der Tagesrhythmus wurde durch Tageslichtlampen reguliert und auf einen 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus eingestellt. Die Raumtemperatur betrug konstant 23°C und die Luftfeuchtigkeit 50%.

2.2.2 Herstellung G-CSF defizienter Mäuse

Über die gezielte Ausschaltung des G-CSF-Gens wurde erstmals von Lieschke et al. im Jahr 1994 berichtet. Hierbei wurde mittels Elektroporation ein Genkonstrukt über einen Bakteriophagen-Vektor in das Genom von 129/OLA-stämmigen embryonalen Stammzellen an die Stelle des G-CSF-Gens integriert. Dieses Genkonstrukt bestand aus 1.1 kb der ursprünglichen G-CSF Promotorregion, dem Escherichia coli lac-z Gen, einem 700 bp Fragment des humanen β -Globin-Gens sowie der Neomycinphosphotransferase cDNA. Somit wurden die Basenpaare 5-703 des G-CSF-Gens deletiert. Nachfolgend wird das Genkonstrukt schematisch dargestellt.

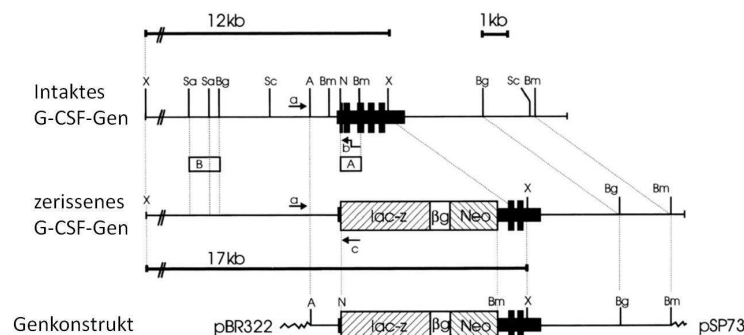


Abbildung 6

Schematische Darstellung des Genkonstrukts des G-CSF-Knockouts; modifiziert nach Lieschke et. al, 1994

Nach zehntägiger Selektion mit G418-Medium wurden die ES-Zellen mittels PCR untersucht und genotypisiert. Es wurden 3 verschiedene Primer benutzt: Primer A (5'TCCATGACATCTGTGGCCACCAGA-3') entsprechend der 3' Sequenz der Asp700 Stelle des G-CSF Promoters; Primer B (5'-CGGCCTCTCGTCCTGACCATA- GTG-3') entsprechend der 5'Sequenz des Exon 2 des G-CSF Gens, das durch das integrierte Konstrukt deletiert wurde (bp 152-175 der G-CSF Gensequenz); und Primer C (5'CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA-3'), entsprechend der 5' Region des E. coli lac-z Gens des Genkonstrukts. Bei Verwendung der Primer A und B wurde somit das Wildtyp- und bei Verwendung von Primer A und C das Knockout-Gen generiert. Mit jeder Probe wurde jeweils eine PCR mit den beiden Primerkombinationen durchgeführt. Bei der PCR mit den

Primern A und B zeigte sich eine Bande bei 1.4 kb und bei der PCR mit den Primern A und C eine Bande bei 1.3 kb.

Daraufhin wurden ES-Zellen, bei denen das Genkonstrukt im Genom nachgewiesen werden konnte, in Blastozysten von C57BL/6-Mäusen injiziert. Die Genotypen dieser Mäuse wurden wiederum mittels PCR kontrolliert [188].

2.2.3 Zucht der G-CSF defizienten Mäuse

Wir erhielten Mäuse aus dem Labor von Professor Erich Wagner, die bezüglich des G-CSF-Gens heterozygot waren. Bei den Verpaarungen wurden nach dem 2. Mendelschen Gesetz in der F1-Generation 50 % heterozygote, 25% homozygot gesunde und 25 % homozygot kranke Tiere geboren. Um die G-CSF-Defizienz nachzuweisen wurde bei vier Wochen alten Mäusen Schwanzproben entnommen. Diese Schwanzproben wurden aufbereitet und mittels Polymerasekettenreaktion genotypisiert. Durch den Ansatz mit zwei Primerkombinationen (Primer A + B und Primer A + C) ergaben sich somit folgende mögliche Ergebnisse:

	G-CSF Wildtyp	G-CSF Knockout	G-CSF heterozygot
Primer A+B	X		X
Primer A+C		X	X
Verteilung	0,25	0,25	0,5

Tabelle 2

Mögliche Genotypen in der F1-Generation

Aufgrund des geringen Unterschiedes des Genproduktes (1.3 kb und 1.4 kb) nutzten wir zwei PCR-Ansätze, um mögliche Verwechslungen auszuschließen. In nachfolgenden Abbildungen wird dies veranschaulicht.

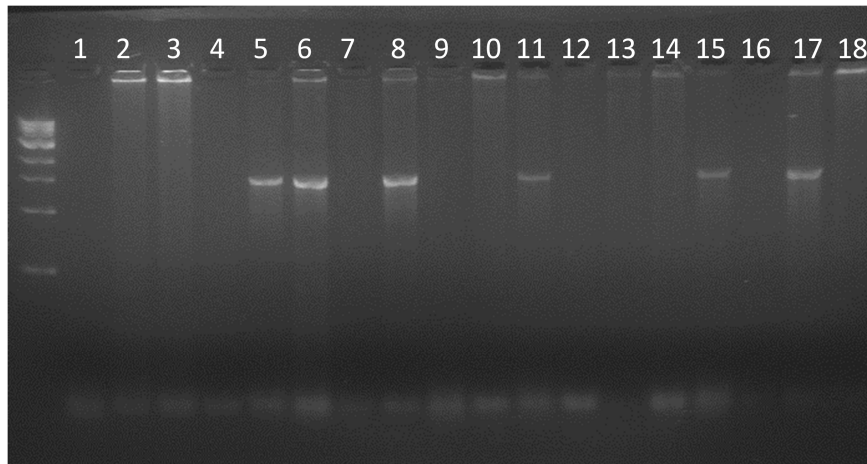


Abbildung 7

Agarose-Gelelektrophorese der DNA-Produkte mit Primern A und B (Wildtyp-Gen)

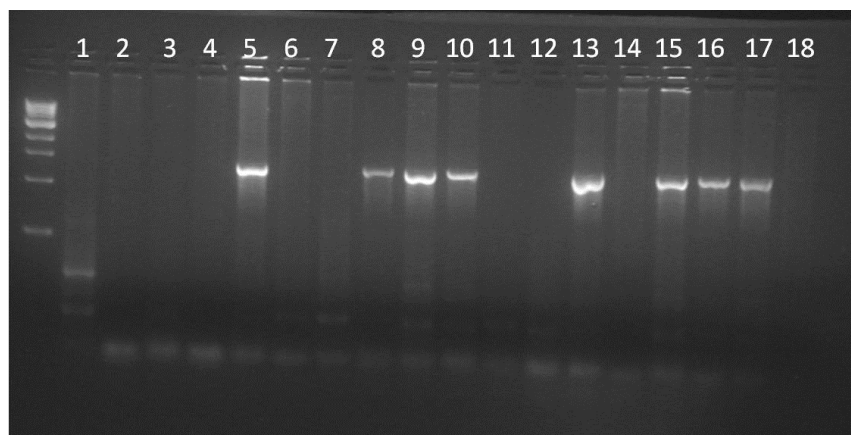


Abbildung 8

Agarose-Gelelektrophorese der DNA-Produkte mit Primern A und C (Knockout-Gen)

In diesem Beispiel konnte also bei den Tieren mit den Nummern 9,10,13 und 16 das oben beschriebene Genkonstrukt nachgewiesen werden. Diese Mäuse konnten demzufolge G-CSF nicht synthetisieren.

In der darauffolgenden Generation wurden nur die G-CSF defizienten Tiere verpaart. Somit wurden in der F2-Generation nur G-CSF defiziente Tiere geboren, welche dann für die Versuche benutzt werden konnten.

2.2.4 Versuchsaufbau

Den Tieren wurde an Tag 0 durch Ligation der Left anterior descending artery (LAD) ein Herzinfarkt induziert. Die Behandlung begann gemäß dem Behandlungsschema nach Operationsende und wurde alle 24 h durchgeführt. Die Behandlung endete an Tag 5.

Je nach Gruppe wurden die Tiere in dieser Weise mit Saline (Kontrolle) oder mit PTH (Therapiegruppe) behandelt. Nachfolgend sind die verschiedenen Gruppen dargestellt.

Name der Gruppe	Wildtyp	G-CSF Knockout	Saline	PTH
Wildtyp + MI + Saline	Ja	Nein	Ja	Nein
Wildtyp + MI + PTH	Ja	Nein	Nein	Ja
Knockout + MI + Saline	Nein	Ja	Ja	Nein
Knockout + MI + PTH	Nein	Ja	Nein	Ja

Tabelle 3: Aufteilung der verschiedenen Gruppen

An Tag 2 wurde ein Elisa zur Bestimmung der Homingfaktoren durchgeführt.

An Tag 6 wurden die Hämodynamik mittels Millar-Tip-Katheter, der Stammzellanteil in Blut und Herz mittels Durchflusszytometrie und die Morphologie der Infarktzone durch Histologie untersucht.

An Tag 30 wurden wiederum die Hämodynamik und die Infarktzone untersucht. In nachfolgender Übersichtstabelle sind die Gruppen und die durchgeführten Untersuchungen noch einmal schematisch aufgeführt.

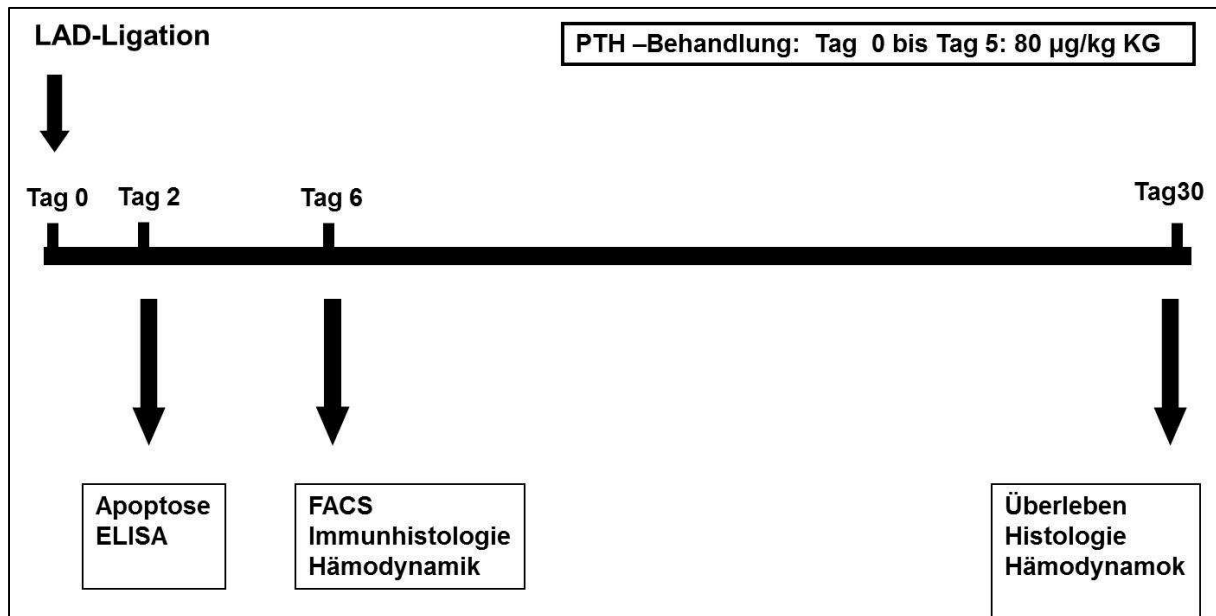


Abbildung 9: Versuchsaufbau

2.2.5 Mausmodell

2.2.5.1 Infarktinduzierung

Die Narkose erfolgte mit einer Narkosemischung aus einem Anästhetikum (100mg/kg KG Ketamin) und einem α_2 -Adrenorezeptoragonisten (20 mg/kg KG Xylazin), welcher sowohl muskelrelaxierende als auch analgetische Wirkung hat. Diese Medikamente wurden in NaCl verdünnt und intraperitoneal injiziert. Die chirurgische Toleranz war nach ungefähr fünf Minuten erreicht und die Wirkdauer betrug circa 40 Minuten.

Nach Einsetzen der Wirkung der Narkose wurde die Maus auf dem Rücken an einer selbstregulierenden Wärmeplatte mit Klebestreifen fixiert. Danach wurde der Oberkiefer mit einem Gummiband fixiert, um einen besseres Arbeitsfeld für die Intubation zu schaffen.

Die Intubation erfolgte nun unter direkter Sicht auf die Trachea. Hierfür wurde die Haut im Halsbereich circa 1 cm lang longitudinal eröffnet und die Glandula mandibularis stumpf mobilisiert. Mit einer Pinzette wurde daraufhin der Unterkiefer gegriffen, um den Tubus

(Metallkanüle 19 Gauge) in den Pharynx einführen zu können. Nun wurde der Tubus unter visueller Lagekontrolle in der Trachea platziert. Der Intubationserfolg wurde durch sichtbare Thoraxexkursionen bestätigt. Die Beatmung mit einem Atemvolumen von ungefähr 200 µl und einer Frequenz von 150/min erfolgte mit einem Beatmungsgerät (Hugo Sachs Electronics), das über Plastikschläuche mit dem Tubus verbunden war. Anschließend wurde der Hautschnitt mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (5-0 Ethibond).

Zur Temperaturkontrolle wurde eine Analsonde eingeführt, welche die rektale Temperatur der Maus maß und die gemessene Temperatur mittels Temperaturveränderungen der Wärmeplatte regulierte. Somit wurde die Körpertemperatur der Maus bei einer Temperatur von circa 37,5 °C konstant gehalten.

Nach Enthaarung der linken Thoraxseite mit einem Keratinolytikum und der Desinfektion mit Jod wurde ein Hautschnitt auf Höhe des 2. Intercostalraumes durchgeführt. Nun wurden die Musculus pectoralis und Musculus rectus thoracis auf dieser Höhe durchtrennt, um Sicht auf die Intercostalmuskulatur zu schaffen. Unter Schutz der Arteria mammaria sinistra wurde der 2. Intercostalraum mit einer Mikroschere eröffnet. Um ein geeignetes Sichtfeld auf die LAD herzustellen, wurden die 2. und 3. Rippe jeweils zweifach mit einem Faden (5-0 Ethibond) umstochen und nach kranial beziehungsweise kaudal aufgespannt. Die Enden der beiden Fäden wurden mit Klebestreifen auf der Wärmeplatte fixiert.

Im Anschluss wurde das Perikard eröffnet, um die Suche nach der LAD zu erleichtern. Das Perikard wurde zum Schutz der Lunge über die Pleura gelegt und mithilfe eines in Jod getränkten Tupfers auf dem Thorax befestigt. Anschließend wurde die LAD am freiliegenden Herzen aufgesucht und circa einen Millimeter unter dem linken Herzohr mit einer 8-0 Prolene-Faden umstochen und ligiert. Eine Erfolgskontrolle erhielt man durch die deutliche Entfärbung des Versorgungsgebietes der LAD.

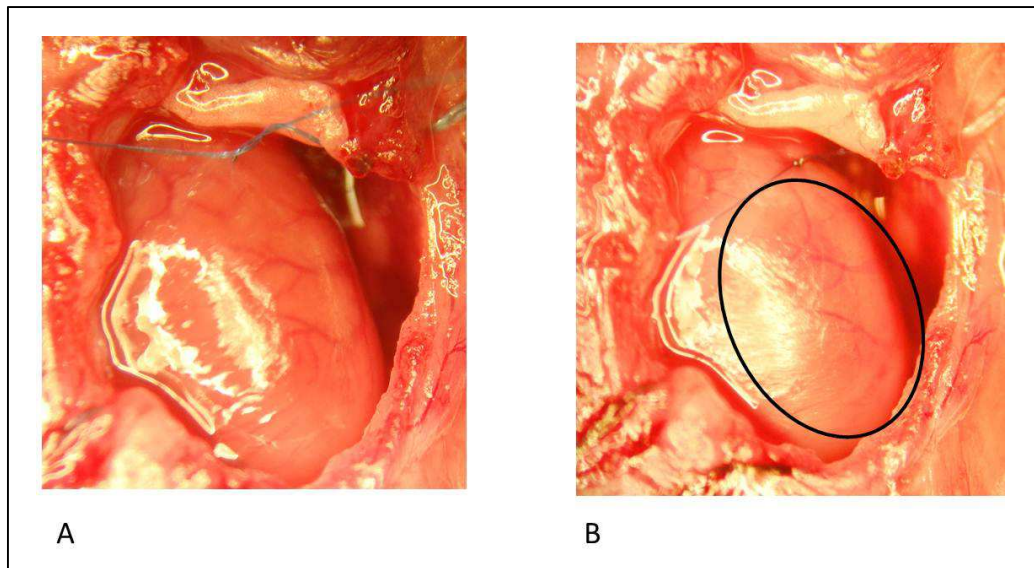


Abbildung 10: LAD Ligation; A: vorgelegter Knoten um die LAD; B: Abblassung des Myokards nach Ligation; schwarze Umrandung zeigt das Infarktgebiet

Daraufhin wurden die Spannfäden entfernt und der Thorax mit zwei bis drei Einzelknopfnähten (5-0 Ethibond) verschlossen. Der Musculus pectoralis und Musculus longus thoracis als auch die Haut wurden mit fortlaufenden Nähten verschlossen (5-0 Ethibond). Die OP-Dauer betrug circa 35 Minuten.

Die Maus wurde bis zum Erreichen einer suffizienten Eigenatmung maschinell beatmet und daraufhin extubiert und in den Käfig unter eine Wärmelampe gelegt. Um einen operativen Einfluss auf die Ergebnisse auszuschließen, wurden in die statistische Auswertung nur Mäuse einbezogen, die die OP 24 Stunden überlebten.

2.2.5.2 Gabe von Parathormon

Den Tieren der Therapiegruppen wurde direkt nach der Operation 80 $\mu\text{g/kg KG}$ PTH intraperitoneal injiziert. Es folgte eine tägliche Behandlung mit PTH bis zum fünften Tag. Den Kontrollgruppen wurde im gleichen Schema Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) verabreicht, um den Einfluss der Injektion zu kontrollieren. Zur Schmerztherapie wurde den Mäusen täglich Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kgKG) verabreicht.

2.2.5.3 Hämodynamik

2.2.5.3.1 Funktionsweise des Millar-Tip-Katheters

Zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter nutzen wir einen Millar Tip-Katheter (1.4 French, Hugo Sachs Electronics). Dieser Katheter funktioniert nach dem Prinzip der Conductance-Messung, wobei hier durch die Messung der Leitfähigkeit einer Flüssigkeit das relative Volumen dieser Flüssigkeit berechnet werden kann. Diese Methode wurde erstmals 1981 von Baan et al. vorgestellt [189]. Zusätzlich enthält der verwendete Conductance-Katheter einen Drucksensor, wodurch die gleichzeitige Ableitung von Druck und Volumen ermöglicht wird.

Der Millar-Tip-Katheter enthält zur Messung des Volumens 4 Elektroden. Durch die zwei äußeren Elektroden wird ein elektrisches Feld mit der Leitfähigkeit G generiert. Diese Leitfähigkeit G wird dann von den beiden inneren Elektroden (Messelektroden) gemessen. Der Katheter wird nun so platziert, dass sich die distale Elektrode an der Herzspitze und die proximale Elektroden direkt unterhalb der Aortenklappe befindet. Da sich die Leitfähigkeit in dem erzeugten elektrischen Feld analog zu dem Volumen verändert, kann das intraluminale Volumen während der verschiedenen Stadien des Herzzyklus gemessen werden.

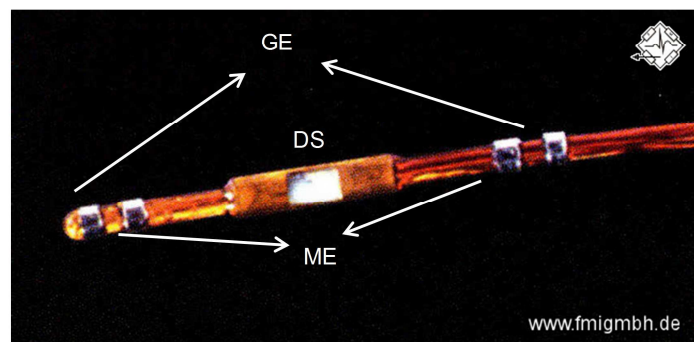
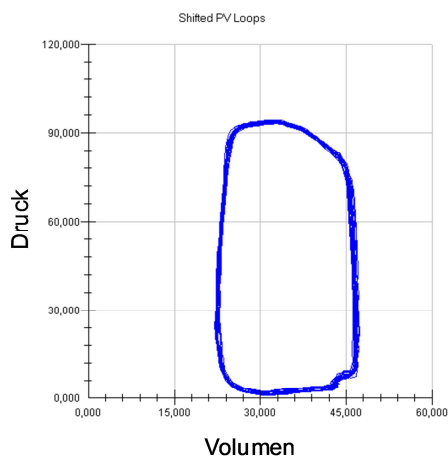


Abbildung 11

Links: Beispiel einer Druck Volumen-Kurve; **Rechts:** Großaufnahme der Spitze des Millar-Tip-Katheters (GE: Generatorelektroden; ME: Mess-Elektroden; DS: Drucksensor)

Ein Problem bei dieser Methode ist, dass nicht nur die Leitfähigkeit des Blutes gemessen wird, sondern auch die des umliegenden Gewebes (z.B. Myokard). Diese Störgröße nennt man parallele Conductance. Sie wird wie im folgenden Kapitel beschrieben berechnet und muss von der Gesamtleitfähigkeit abgezogen werden, um die tatsächliche Leitfähigkeit des Blutes zu errechnen.

2.2.5.3.2 Parallele Conductance (Parallele Leitfähigkeit)

Der Conductance-Katheter misst das Volumen einer Flüssigkeit bzw. eines Gewebes anhand dessen Leitfähigkeit. Der Katheter kann aber nicht zwischen verschiedenen Geweben beziehungsweise Flüssigkeiten unterscheiden und misst somit in unserem Fall nicht nur die Leitfähigkeit des intraluminalen Blutvolumens sondern auch die des umliegenden Gewebes. Diese Störgröße wird parallele Conductance genannt. Das aus der Leitfähigkeit der parallelen Conductance $G(p)$ resultierende Volumen $V(p)$ muss also von dem Gesamtvolumen $V(t)$ nachträglich abgezogen werden.

Um die parallele Conductance zu berechnen, wird über die Vena Jugularis eine definierte Menge hypersaliner Lösung (10µl 10%iger Saline) injiziert. Dies erhöht die Leitfähigkeit des Blutes für eine kurze Zeitspanne, jedoch nicht die des umliegenden Gewebes. Die Veränderung der Leitfähigkeit und somit die Veränderung der Ventrikelvolumina wird über einige Herzaktionen aufgezeichnet.

Das Volumen des umliegenden Gewebes kann nun mithilfe von zwei Geraden berechnet werden. Die eine Gerade beschreibt den leeren Ventrikel ($V_{endsystolisch} = V_{enddiastolisch}$), die andere Gerade die Ventrikelvolumina der Saline-Messung. Der Schnittpunkt dieser beiden Geraden beschreibt das Volumen der parallelen Conductance $V(p)$.

Mit folgender Gleichung wird somit aus der Leitfähigkeit das linksventrikuläre Volumen V berechnet:

$$V(t) = (1/\alpha) (L^2/ob) \times (G(t) - G(p))$$

$V(t)$: zeitabhängiges ventrikuläres Volumen

α : Korrekturfaktor: $\text{Schlagvolumen}_{\text{Conductance}} / \text{Schlagvolumen}_{\text{Referenzmethode}}$

L: Elektrodendistanz

ob: spezifische Leitfähigkeit des Blutes

G(t): Gesamtleitfähigkeit

G(p): Leitfähigkeit des umliegenden Gewebe

2.2.5.3.3 Versuchsablauf

Das Versuchstier wurde mit einer Narkosemischung (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl) anästhesiert und nach Narkoseeintritt auf dem Rücken auf einer Wärmeplatte mit Klebestreifen fixiert. Zur Temperaturregulierung erhielt die Maus eine Analsonde, mit der die Wärmeplatte so reguliert wurde, dass die Maus eine Körpertemperatur von circa 37,5 °C hatte.

Um eine optimale Sicht auf das Operationsfeld zu schaffen wurde die Haut über dem Halsbereich großzügig entfernt und die Maus unter Sicht wie oben beschrieben intubiert. Nach Freilegung der Trachea und des rechten M. sternocleidomastoideus wurde dieser Muskel möglichst kranial durchtrennt. Dadurch wurde eine freie Sicht auf die darunter verlaufende Gefäß-Nerven-Scheide, die die A. carotis interna dextra (ACI) und den N. Vagus dextra enthält, geschaffen. Unter Schonung des N. vagus, um den physiologischen Einfluss des parasympathischen Nervensystems auf die Hämodynamik nicht zu beeinträchtigen, wurde die Gefäß-Nervenscheide eröffnet und die ACI freigelegt.

Nun wurde die ACI mit zwei Bindfäden proximal und distal umschlungen. Der distale Bindfaden wurde sogleich ligiert, um durch einen Rückstau des Blutes in der ACI den Gefäßdurchmesser zu vergrößern. Am proximalen Bindfaden wurde der Knoten nur locker vorgelegt, um eventuelle Blutungen möglichst rasch stoppen zu können (Abbildung 12). Mithilfe eines Metallspanners wurde die ACI aufgespannt und fixiert. Unter ständiger Befeuchtung wurde die ACI nun mit einer Kanüle punktiert und der Katheter mit einer silikonbeschichteten Pinzette eingeführt. Nach Entfernung des Metallspanners wurde der Katheter nun unter ständiger Lagekontrolle mittels der Druckkurve am Computer in die Aorta ascendens und durch die Aortenklappe bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Durch kleine Lageveränderungen wurde der Katheter optimal platziert. Nach Normalisierung der Hämodynamik wurden die Basalwerte aufgezeichnet.

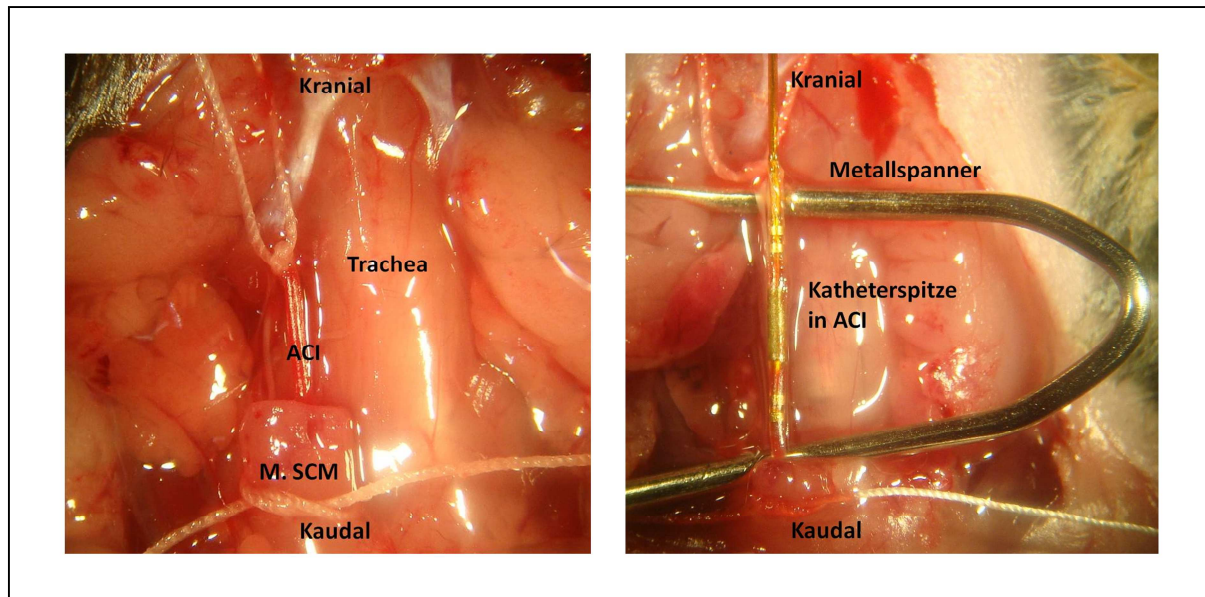


Abbildung 12

Fotographien des OP-Feldes; links: nach Durchtrennung des M. sternocleidomastoideus (ACC: Arteria carotis communis; M.SCM: Musculus sternocleidomastoideus) rechts: nach Einführung des Katheters in die Art. carotis communis

Um die parallele Conductance wie oben beschrieben messen zu können, wurde am Ende jeder Messung noch eine Salineinjektion vorgenommen. Hierbei wurde die linke V. jugularis freipräpariert und eine festgelegte Menge (10 µl) an hypersaliner Lösung (4,5 % NaCL) injiziert.

2.2.5.3.4 Aufzeichnung und Messparameter

Die Signale des Millar Tip-Katheter wurden über eine Druckleitung mit einem Druckaufnehmer (Millar ARIA) verbunden. Dessen Signale wurden über einen Zwei-Kanal-Brückenverstärker in die Computermessapparatur (Dell) eingespeist. Die Signale wurden kontinuierlich mittels des Programms HSE Isoheart aufgezeichnet und mithilfe der Software Millar PVAN 2.9 ausgewertet. Unser Interesse lag besonders in folgenden Parametern:

- Herzfrequenz (HF) in 1/min
- Maximaler Blutdruck (LVP) in mmHg
- Ejektionsfraktion (EF) = $(EDV - ESV) / EDV \cdot 100$ (in %)
- Herzminutenvolumen (HMF; cardiac output) = $HF \cdot SV$ (in µl/min)

2.2.6 Histologie

Die histologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Müller-Höcker durchgeführt.

Es wurden histologische Schnitte an Tag 2, 6 und Tag 30 angefertigt. Hierfür wurden die Mäuse nach beendeter Kathetermessung in tiefer Narkose durch Genickbruch getötet. Der Thorax wurde mittels medialer Thorakotomie eröffnet und das Herz explantiert. Nach Ausspülen der Blutreste aus den Herzhöhlen mit Natriumchlorid-Lösung wurde das Präparat nochmals mit 4%-iger Formalinlösung durchspült und im Anschluss in 4%-iger Formalinlösung fixiert und bei 4°Celsius gelagert. Daraufhin wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholgefolge entwässert, in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom in circa 4 µm dicke Präparate geschnitten und auf Objektträgern fixiert.

2.2.6.1 Färbungen

2.2.6.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin wird aus dem Blauholzbaum gewonnen und zu Hämalalaun aufbereitet. Hämalalaun färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit DNA. Eosin ist ein synthetischer, saurer Farbstoff und färbt alle eosinophilen Strukturen rot, so dass vor allem die Zellplasmaeigenschaften erfasst werden [190].

2.2.6.1.2 Masson-Goldner-Trichromfärbung

Es werden nach der Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert drei disperse Farbstoffe (Säurefuchsin, Ponceau de Xylidin, Anilinblau) gleichzeitig angewendet. Im Färbeargebnis stellen sich kollagenes Bindegewebe, wie z.B. Myokardinfarktfolgen, grün dar, Zellkerne braunschwarz und alle übrigen Strukturen in Rottönen [191].

2.2.6.2 Morphologische Untersuchungen

Für die morphologischen Untersuchungen im Rahmen des Remodelings (Infarktgröße und Wanddicke) wurden Masson-Goldner-Färbungen von Schnitten von je 6 Mäusen pro Gruppe ausgewertet.

2.2.6.2.1 Infarktgröße

Um die Infarktgröße zu berechnen, wurden Schnitte auf vier verschiedenen Ebenen angefertigt (Abbildung 13). Anschließend wurden diese Schnitte planimetrisch vermessen. Dabei wurde für jeden Schnitt der Quotient aus infarzierter Fläche (AI) und der Gesamtfläche des linken Ventrikels (LV) errechnet. Somit konnte der prozentuale Anteil des infarzierten Gewebes bestimmt werden.

$$\frac{AI}{LV} = \frac{\text{infarzierte Fläche (Area of infarction) in mm}^2}{\text{Gesamtfläche der Wand des linken Ventrikels (inklusive Septum) in mm}^2}$$

Um auch die Längsausdehnung des Infarktes zu berücksichtigen, wurde auch diese gemessen und anschließend der Quotient aus der Längsausdehnung des Infarktes (LI) und der Gesamtlänge (GL) des Herzens gebildet.

$$\frac{LI}{GL} = \frac{\text{Längsausdehnung des Infarkts in mm}^2}{\text{Gesamtlänge des linken Ventrikels in mm}^2}$$

Die endgültige Infarktgröße berechnete sich aus dem Mittelwert der prozentualen Anteile des infarzierten Gewebes der vier Schnitte multipliziert mit dem Quotienten LI/GL.

$$\text{Infarktgröße in \%} = \left(\frac{AI_1}{LV_1} + \frac{AI_2}{LV_2} + \frac{AI_3}{LV_3} + \frac{AI_4}{LV_4} \right) \div 4 \times \frac{LI}{GL} \times 100$$

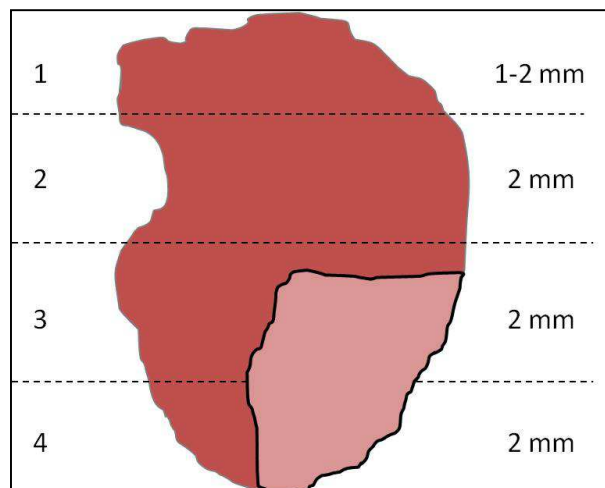


Abbildung 13

Schematische Darstellung der Schnittebenen bei der Bestimmung der Infarktgröße (Dunkel: funktionstüchtiges Myokard; Hell: Infarktnarbe)

2.2.6.2.2 Wanddicke im Infarktgebiet

Die Wanddicke wurde bei einer 15-fachen Vergrößerung von Querschnitt 3 in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (siehe 2.2.6.1.1) bestimmt.

Hierfür wurde das Infarktareal in 5 gleich große Segmente geteilt. Nun wurde in diesen Segmenten jeweils die Stelle mit der geringsten Wanddicke gemessen. Zur Bestimmung der Wanddicke wurde eine Tangente an diesen Punkt angelegt und im 90° Winkel zur Tangente die Wanddicke gemessen. Aus diesen fünf Werten wurde daraufhin der Mittelwert errechnet und als Wanddicke in mm angegeben.

2.2.6.3 Immunhistochemische Untersuchungen

2.2.6.3.1 Neovaskularisation (PECAM-1/CD31)

Das Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1/CD31) ist ein 130-kd Glykoprotein, welches als Adhäsionsmolekül für Zell-Zell-Verbindungen vaskulärer Endothelzellen fungiert. Aufgrund dieser Funktion ist es ein wesentlicher Bestandteil der Angiogenese, bei der sich Endothelzellen aus einem Verband lösen und neue Gefäße bilden. Hierfür sind Adhäsionsmoleküle wie CD31 nötig [192]. CD31 wird in geringerem Maße auch auf zirkulierenden Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und bestimmten T-Tell-Subpopulationen exprimiert [193]. Aufgrund seiner vielfach erhöhten Dichte auf Endothelzellen und seiner Eigenschaften im Rahmen der Angiogenese ist es seit Jahren ein etablierter Marker für das Maß der Neovaskularisation in einem Gewebe[194, 195].

2.2.6.3.2 Apoptose (TUNEL)

Die Apoptose ist ein stark regulierter Mechanismus, der den organisierten Tod und die Abräumung von Zellen reguliert. Apoptotische Zellen erfahren grundlegende morphologische Veränderungen wie Zellkernschrumpfung, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Aufteilung der Zelle in apoptotische Körper, welche dann phagozytiert werden.

Um apoptotische Zellen nachzuweisen, wurde eine TUNEL-Assay (Terminal Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling) durchgeführt. Hierfür wurde der „Apoptag® peroxidase in situ apoptosis detection kit“ benutzt.

Bei der DNA-Fragmentierung entstehen durch Einzel- beziehungsweise Doppelstrangbrüche freie OH-Gruppen [196]. Bei dem TUNEL-Assay werden mittels des Enzyms Terminale-Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) markierte Nukleotide (Desoxyuridintriphosphat-Digoxigenin) an diese freien OH-Gruppen der DNA-Strangbrüche eingefügt [197]. Daraufhin wird ein Antikörper gegen Digoxigenin hinzugefügt, welcher mit einer Peroxidase verbunden ist. Durch diese Peroxidase entsteht eine permanente intensive Färbung der Strangbrüche und somit der apoptotischen Zellen. Diese Färbung erscheint unter dem Lichtmikroskop bräunlich.

2.2.7 Durchflusszytometrie

2.2.7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode bei der die Größe, Granularität und das Vorkommen von verschiedenen Oberflächenantigenen auf Zellen untersucht werden können. Bei dem FACS (fluorescence-activated cell sorting) werden Zellsuspensionen nach Inkubation mit monoklonalen Antikörpern, welche an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind, untersucht. Diese Antikörper haften an bestimmten Oberflächenantigenen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Somit kann die Quantität bestimmter Zellpopulationen in den untersuchten Zellsuspensionen analysiert werden.

Nach Aufbereitung der verschiedenen Gewebe (siehe 2.2.7.2) wird die entstandene Zellsuspension durch ein Saugröhrchen mit hoher Geschwindigkeit in die Flusskammer gesaugt. Die Küvette, in welche die Suspension gesaugt wird, ist mit Trägerflüssigkeit gefüllt, wodurch ein laminarer Hüllstrom entsteht. Durch den schnellen Fluss reihen sich die Zellen wie in einer Perlenkette hintereinander und können so einzeln untersucht werden (hydrodynamische Fokussierung). Nun werden die Zellen mit einem monochromatischen Argonlaser (488nm) beschossen. Die Größe und Granularität der Zellen kann hierbei durch die Lichtbrechung beurteilt werden. Die Größe der Zellen wird hierbei durch das Maß der Streuung in flachem Winkel beurteilt (forward scatter); die Granularität der Zellen wird durch das Maß der Streuung im rechten Winkel gemessen (sideways scatter). Begleitend zu diesen Messungen können Oberflächenantigene durch gebundene fluoreszierende Antikörper bestimmt werden. Hierbei werden die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laserstrahl kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau angehoben. Bei der Rückkehr auf ihr normales Energieniveau werden Photonen freigesetzt, die mittels Photodetektoren gemessen werden. Die Anzahl der freigesetzten Photonen korreliert mit der Anzahl der gebundenen

Antikörper und somit der Anzahl der Oberflächenantigene. Die von uns benutzten Antikörper (FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin Chlorophyll-A-Protein)) hatten alle ein ähnliches Absorptionsmaximum (485-495 nm). Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen war möglich, weil die eingesetzten Farbstoffe zwar ähnliche Absorptionsmaxima hatten aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische, Emissionsspektren verfügten. Die Überlappung der Emissionsspektren der Fluoreszenzen konnte mithilfe von Signalverstärkungen der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sie sich eindeutig voneinander abgrenzen ließen. Diese Justierung wurde mit Hilfe von Isotypen, unspezifisch bindende Antikörper der jeweiligen Farbe, durchgeführt.

2.2.7.2 Aufbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie wurden das periphere Blut und das Herz untersucht.

Die Maus wurde wie unter 2.2.6.1. beschrieben narkotisiert und auf der Wärmeplatte fixiert. Danach wurde nach dem Hautschnitt die thorakale Muskulatur durchtrennt und das Herz durch die Zwischenrippenmuskulatur punktiert. Das Blut wurde in einer mit 2 µl Heparin gefüllten 2-ml-Spritze entnommen. Nach der Blutabnahme wurde die Maus in tiefer Narkose per Genickbruch getötet und das Herz entnommen.

Das Blut/Heparin-Gemisch wurde nun vorsichtig auf 3 ml Ficoll-Lösung pipettiert und bei 136 g, 4°C und Bremse 1 für 30 min zentrifugiert. Durch die Eigenschaften der Ficoll-Lösung war es möglich, die Bestandteile des Blutes in verschiedene Phasen aufzutrennen und somit die mononukleären Zellen von den anderen Blutbestandteilen zu isolieren. Die trüb gefärbte Phase der mononukleären Zellen, welche zwischen der Phase des Plasmas und des Ficolls zu liegen kam, wurde vorsichtig mit der Pipette entnommen und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Daraufhin folgten zwei Waschschrte mit PBS und ein Waschschrte mit PBS/BSA 2% bei 72 g, 4°C und Bremse 3 für 10 Minuten. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Überstand bis auf 1 ml abgenommen und die Probe resuspendiert.

Nach der Explantation des Herzens wurden die Herzhoren und die großen Gefäße reseziert. Um eine myozytenfreie Suspension zu erhalten wird das Herz mit einem Skalpell zerkleinert und zur Denaturierung mit 6 ml einer 0,1%igen Kollagenase bei 36°C für 45 Minuten inkubiert. Durch regelmäßiges Durchmischen der Probe während der Inkubationszeit konnte

die Denaturierung verbessert werden. Nach 45 Minuten wurde die Probe durch ein 70 µm Sieb in ein 50 ml Tube überführt. Die filtrierte Suspension wurde nun vorsichtig in ein weiteres mit 15 ml Ficoll gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 136 g, 4°C und Bremse 1 für 30 min zentrifugiert. Auch hier wurde die trübe Phase, in der sich die mononukleären Zellen befanden, entnommen und in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Waschschrte erfolgten wie bei der Aufbereitung der Blutprobe.

Die beiden entstandenen Proben wurden dann gemäß des Protokolls in Tabelle 4 befüllt und für 45 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten wurden die Proben nun gemessen. Wir benutzten zur FACS-Analyse einen Zytometer der Firma Beckman Coulter (Coulter Epics XL) und die dazugehörige Software. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten wurden jeweils 50000 Zellen gemessen.

Probenname	Iso A	CD 31	CXCR4
PBS/BSA 2%	20	20	20
Iso A – PE	10		
Iso A – FITC	10		
Iso A- PerCP	10		
CD45 PerCP		10	10
CD34 FITC		1	1
CD31 PE		10	
CXCR4 PE			10

Tabelle 4

Pipettierschema für die FACS-Analyse; Mengenangaben in µl

2.2.8 Enzyme-linked-immunoassay (ELISA)

Um die Menge an myokardialem SDF-1 nachzuweisen, führten wir einen Enzym-gekoppelten Immunoassay durch. Hierfür nutzten wir den Quantikine Mouse CXCL12/SDF-1 α Kit von R&D Systems.

Das Herz wurde wie in 2.2.7.2 explantiert und aufbereitet. Nach der Denaturierung mit 0,1% Kollagenase für 45 Minuten wurde die Suspension mithilfe einer Ultraschallsonde homogenisiert. Alle anderen Reagenzien wurden auf Raumtemperatur erwärmt und gemäß der Herstelleranleitung vorbereitet [198]. In eine Mikrotiterplatte (96 well Platte) wurde ein monoklonaler spezifischer SDF-1 α -Antikörper aufgebracht (50 μ l Assay Diluent). Danach wurden 50 μ l Standard, Kontrolle oder Probe hinzugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurde der Überstand, der sich nicht mit dem SDF-1 α -Antikörper verbunden hatte und somit nicht am Boden fixiert war, durch viermalige Aspiration abgewaschen und entfernt. Hierauf wurde ein polyklonaler für SDF-1 α spezifischer enzymgekoppelter Antikörper (100 μ l Konjugat; verbunden mit Meerrettichperoxidase) hinzugegeben, welcher für die Farbreaktion verantwortlich war. Nach zweistündiger Inkubation auf einem Schüttler wurde der Überstand durch viermalige Aspiration abgewaschen. Somit blieben nur noch die Proteine zurück, die sowohl mit dem am Boden befestigten Antikörper als auch dem enzymgekoppelten Antikörper verbunden waren (Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex).

Die quantitative Analyse wurde durch eine Farbreaktion vermittelt. Hierfür wurden nun 200 μ l einer Substratlösung hinzugegeben (Color Reagents A und B) und für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Mithilfe der Meerrettichperoxidase wurde diese Substratlösung enzymatisch umgesetzt, was zu einer grün-bläulichen Lichtreaktion führte, die zu der Menge an SDF-1 α in der Probe proportional war. Die Farbreaktion wurde durch die Stop Solution (50 μ l; Schwefelsäure; Farbumschlag in gelb) nach kompletten Substratumsatz gestoppt und mit einem Densitometrie-Gerät gemessen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software „XFlour“, welche die Extinktionswerte proportional in eine SDF-1 α -Menge umrechnete.

2.2.9 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde je nach Anforderung mit dem studentischen T-Test oder der Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom Bonferroni-Test, durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert von unter 0,05 anerkannt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der G-CSF Defizienz auf die Mobilisation und das Homing verschiedener Stammzellpopulationen unter PTH-Behandlung

In mehreren Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sowohl G-CSF als auch PTH positive Effekte auf die Mobilisation von Stammzellen haben [32, 199]. Die positiven Effekte von PTH wurden auf eine Erhöhung des G-CSF-Levels im peripheren Blut zurückgeführt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Tiere, die mit PTH behandelt wurden, ein verbessertes Homing von CD45+/CD34+ Zellen in das infarzierte Myokard zeigten [33]. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei Tieren, die mit G-CSF behandelt wurden, sogar eine verminderte Migration dieser Zellen in das infarzierte Myokard [200].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss das endogene G-CSF auf die PTH-vermittelten Effekte im Rahmen der Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut und sowie auf das Homing von Stammzellen in das infarzierte Myokard hat.

Die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark und das Homing in das infarzierte Myokard wurden mithilfe der FACS-Technik untersucht. Bei dieser bereits in 2.2.7 beschriebenen Methode kann das Vorkommen verschiedener Oberflächenmarker mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper bestimmt werden. In unserer Arbeit wurden folgende Populationen untersucht:

- CD34+/CD45+
- CD34+/CD45+/CD31+
- CD34+/CD45+/CXCR4+

Hierbei wurde Zellen untersucht, die sowohl den Pan-Leukozytenmarker CD45 als auch den Stammzellmarker CD34 auf ihrer Oberfläche trugen. Als weitere Untergruppen wurden noch CXCR4, welches zusammen mit SDF-1 die CXCR-4/SDF-1-Achse bildet und eine wichtige Rolle für das Homing von Stammzellen spielt [128] und der Endothelzellmarker CD31 untersucht.

3.1.1 Die Mobilisierung von Knochenmarkstammzellen in das periphere Blut durch PTH Behandlung ist G-CSF vermittelt

Um die Mobilisation von Stammzellen ins periphere Blut nachzuweisen, wurde narkotisierten Tieren an Tag 6 durch Aspiration direkt aus dem Herzen Blut entnommen. Nach der Entnahme wurden die Zellen wie in 2.2.7.2 beschrieben aufbereitet und gemessen. Folgende Diagramme zeigen eine repräsentative Darstellung der Messung der CD34+/CD45+ Zellen im peripheren Blut.

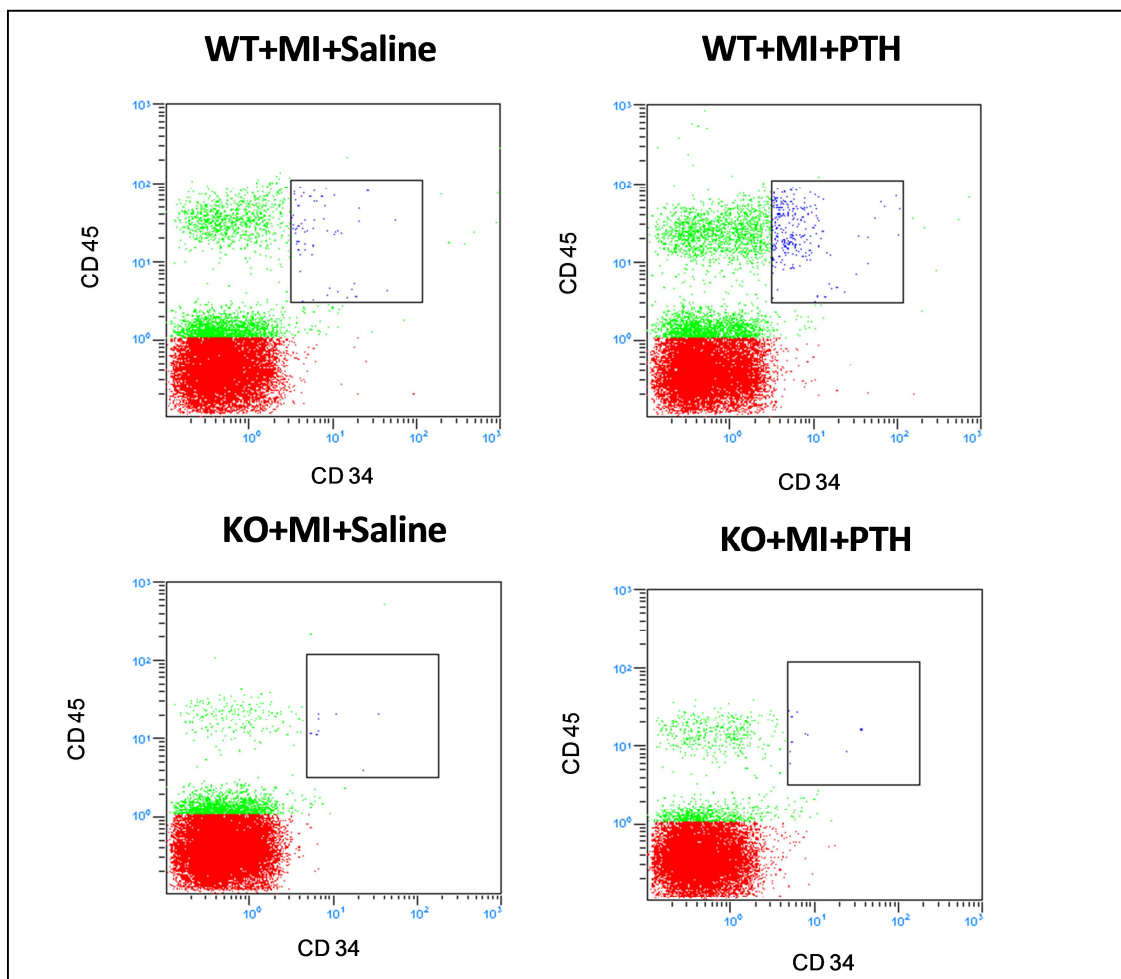


Abbildung 14

Repräsentative Beispiele der FACS-Ergebnisse der Untersuchung des peripheren Blutes von unbehandelten und PTH-behandelten Wildtyp und G-CSF-Knockout-Mäusen auf CD45/CD34-Zellen

In der Wildtyp-Gruppe zeigte sich unter PTH-Behandlung ein signifikanter Anstieg der beschriebenen Stammzellpopulationen im peripheren Blut nach Myokardinfarkt im Vergleich zur Saline-behandelten Gruppe. Dieser Anstieg zeigt sich sowohl in der CD34+/CD45+-Population als auch in den beiden Subpopulationen CD34+/CD45+/CD31+ und CD34+/CD45+/CXCR4+.

Im Gegensatz hierzu konnte in der G-CSF defizienten Gruppe nach PTH-Behandlung kein Anstieg von BMCs im peripheren Blut nachgewiesen werden. In der CD34+/CD45+-Population zeigte sich sogar ein geringfügiger, nicht signifikanter Abfall der Anzahl an BMCs im peripheren Blut unter PTH-Behandlung.

Vergleicht man die mit Saline behandelten Tiere der Wildtyp- und Knockout-Gruppe, so zeigte sich eine erhöhte Anzahl an BMCs im peripheren Blut der Wildtyp-Tiere. Behandelt man die beiden Gruppen mit PTH sahen wir eine signifikant erhöhte Anzahl an BMCs im peripheren Blut der Wildtyp-Gruppe im Vergleich zur G-CSF defizienten Gruppe.

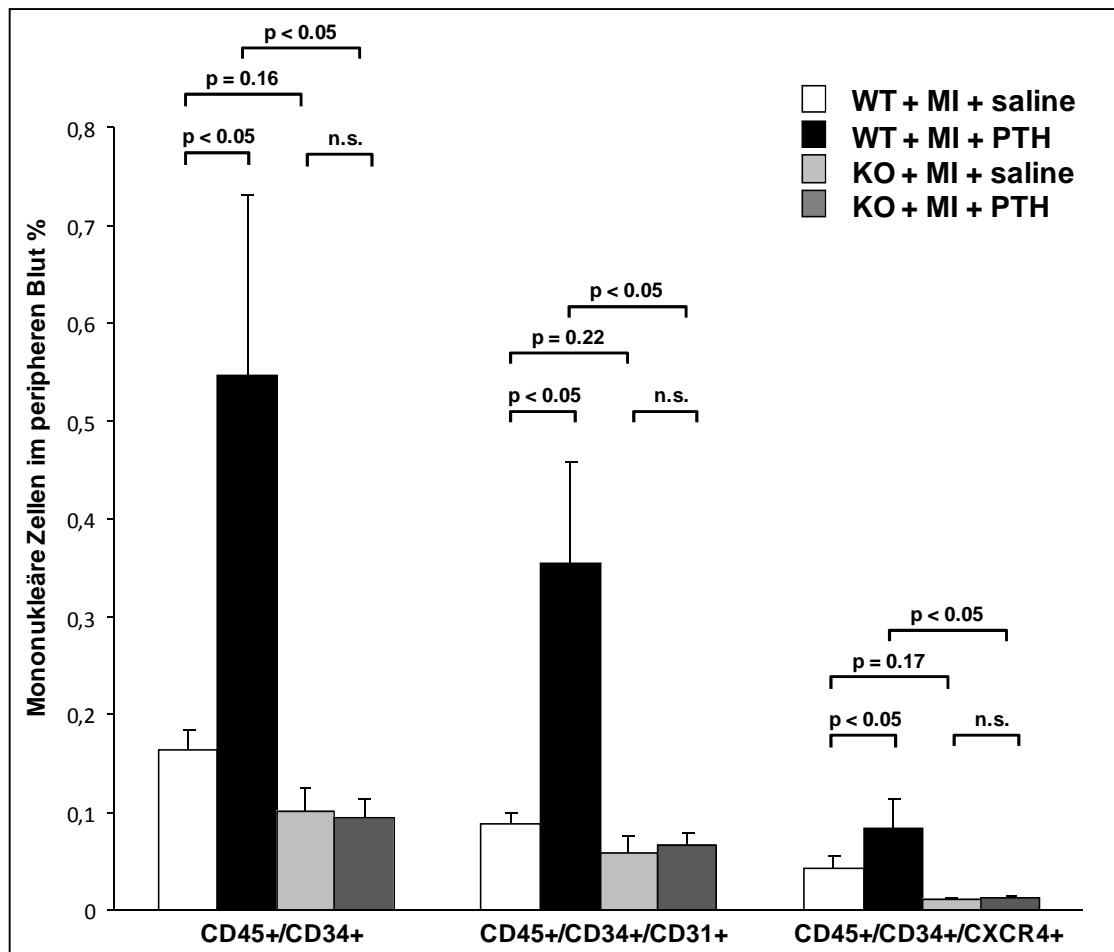


Abbildung 15

Anteil verschiedener Populationen von mononukleären Zellen im Blut ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung von Wildtyp- und G-CSF-Knockout-Mäusen (Links: CD45+/CD34+; Mitte: CD45+/CD34+/CD31+; Rechts: CD45+/CD34+/CXCR4+)

3.1.2 Die Migration von BMCs aus dem peripheren Blut ins ischämische Myokard nach PTH-Behandlung bleibt bei der G-CSF Defizienz erhalten

Um die ins Myokard migrierten BMCs nachzuweisen, wurden Herzen an Tag 6 entnommen und wie in 2.2.7.2 beschrieben aufbereitet. Hierfür wurde nach der Entnahme des Blutes das Herz explantiert, zerkleinert und mit 0,1%-iger Kollagenase für 45 Minuten bei 36°C inkubiert. Diese Aufbereitung diente dazu eine myozyten-depletierte Suspension herzustellen. Nach mehreren Waschschritten wurde die Suspension mit den oben genannten fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Nach einigen weiteren Waschschritten erfolgte die FACS-Messung. Exemplarische Ergebnisse dieser Messungen sind in folgendem

Diagramm dargestellt. Gezeigt wird hier die CD34+/CD45+ Population der ins Myokard migrierten BMCs.

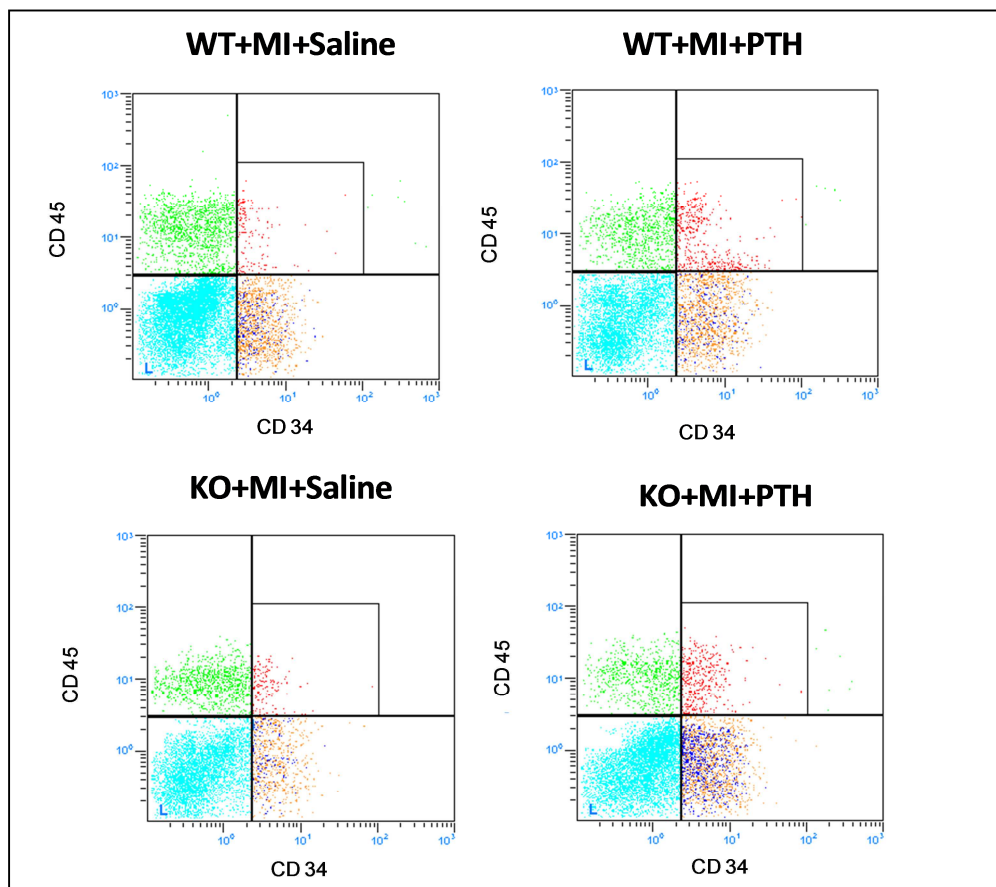


Abbildung 16

Repräsentative Beispiele der FACS-Ergebnisse der Untersuchung des Herzens von unbehandelten und PTH-behandelten Wildtyp und G-CSF Knockout-Mäusen auf CD45+/CD34+-Zellen

Es zeigte sich sowohl in der Wildtyp- als auch in der G-CSF defizienten Gruppe ein signifikanter Anstieg der CD34+/CD45+-Zellen im Herzen nach Behandlung mit PTH. Dieser Anstieg war auch in den Subpopulationen CD34+/CD45+/CD31+ und CD34+/CD45+/CXCR4+ signifikant.

Vergleich man die beiden mit PTH behandelten Wildtyp- und Knockout-Gruppen untereinander, so sah man einen stärkeren Anstieg der ins Myokard migrierten BMCs in der Wildtypgruppe in allen Populationen, welcher jedoch nicht signifikant war.

Die mit Saline behandelten Gruppen zeigten ein unterschiedliches Verhalten in den verschiedenen Populationen. In der CD34+/CD45+-Population und der CD45+/CD34+/CD31+-Subpopulation zeigte sich nur ein geringer Unterschied, welcher eher für ein besseres Homing dieser Zellen in das Herz in der Wildtyp-Gruppe sprach. Im Gegensatz dazu stand die CD45+/CD34+/CXCR-4-Subpopulation, welche in der G-CSF defizienten Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe eine vermehrte Anzahl dieser Zellen im Myokard zeigte. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

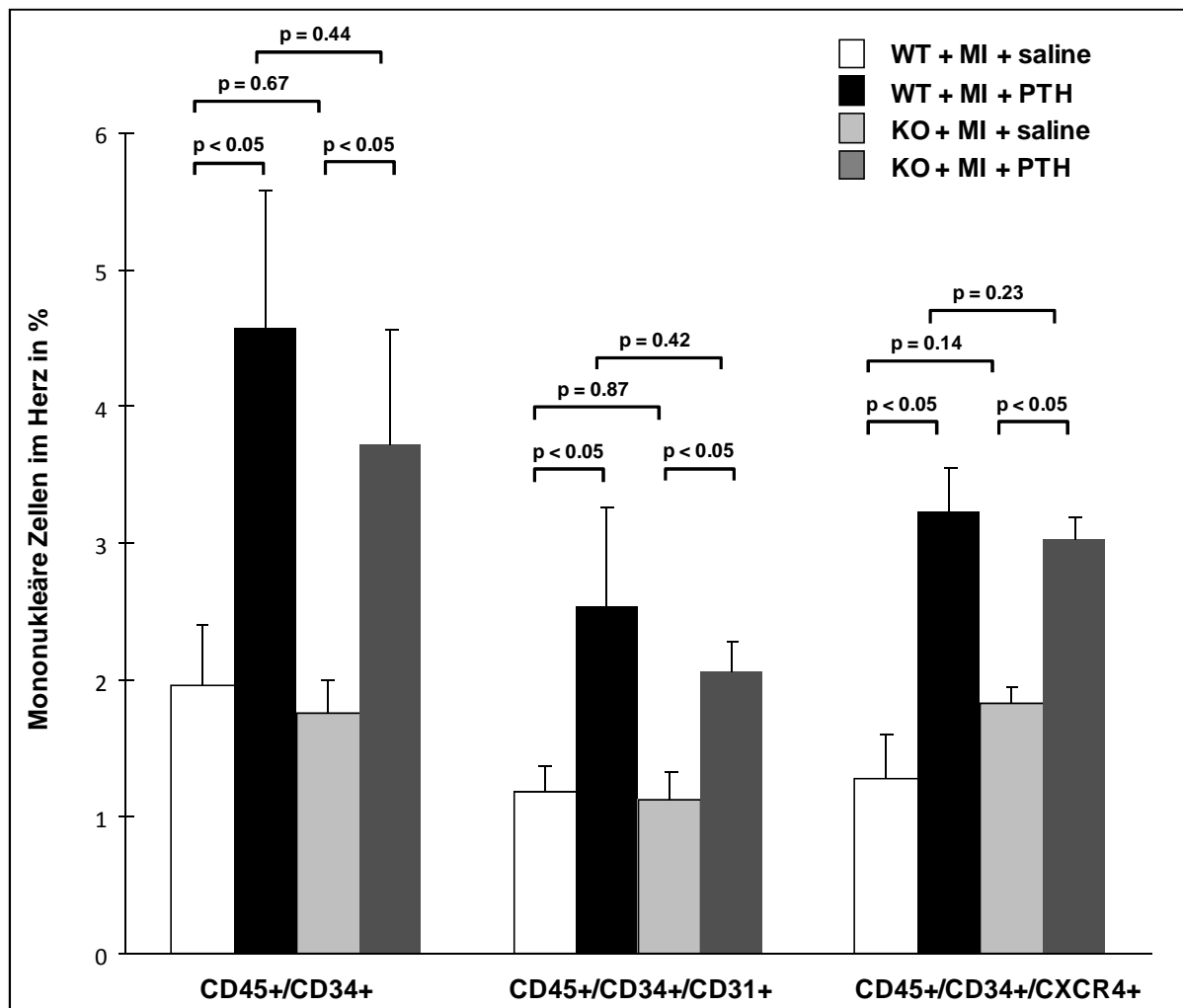


Abbildung 17

Anteil verschiedener Populationen von mononukleären Zellen im Herzen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen (links: CD45+/CD34+; Mitte: CD45+/CD34+/CD31+; Rechts: CD45+/CD34+/CXCR4+)

3.2 PTH Behandlung erhöht den Anteil an Homingfaktoren im Herzen unabhängig vom endogenen G-CSF

Ein wichtiger Mechanismus, über den Stammzellen aus dem peripheren Blut in ischämisches Gewebe gelockt werden, ist die Achse zwischen SDF-1 und CXCR-4 [166]. CXCR-4 befindet sich auf der Oberfläche von zirkulierenden Stammzellen und stellt den Ligand des Homingfaktor SDF-1 dar, welcher unter anderem von Endothelzellen ischämischen Gewebes exprimiert wird.

SDF-1 wird von der Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4/CD26) durch enzymatische Spaltung des N-terminalen Endes inaktiviert [168]. Eine PTH-Behandlung führt durch eine Hemmung von CD 26 zu einer Stabilisierung der SDF-1/CXCR-4-Achse und verbessert so das Homing von zirkulierenden Stammzellen [34].

Es ist bekannt, dass exogen verabreichtes G-CSF durch die Spaltung von CXCR-4 auf mobilisierten BMCs zu einem verschlechterten Homing führt und somit die chemotaktische Wirkung von SDF-1 vermindert wird [148]. Um die Wirkung von endogenem G-CSF auf das SDF-1-Level im Myokard sowohl ohne als auch nach PTH-Behandlung zu untersuchen, führten wir einen ELISA zwei Tage nach Myokardinfarkt durch.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die PTH-Behandlung sowohl in der Wildtyp-Gruppe als auch in der Knockout-Gruppe einen signifikanten Anstieg von SDF-1 im Myokard bewirkte.

Zwischen den Kontrollgruppen der beiden Genotypen konnte kein Unterschied im SDF-1-Gehalt der Herzlysate festgestellt werden.

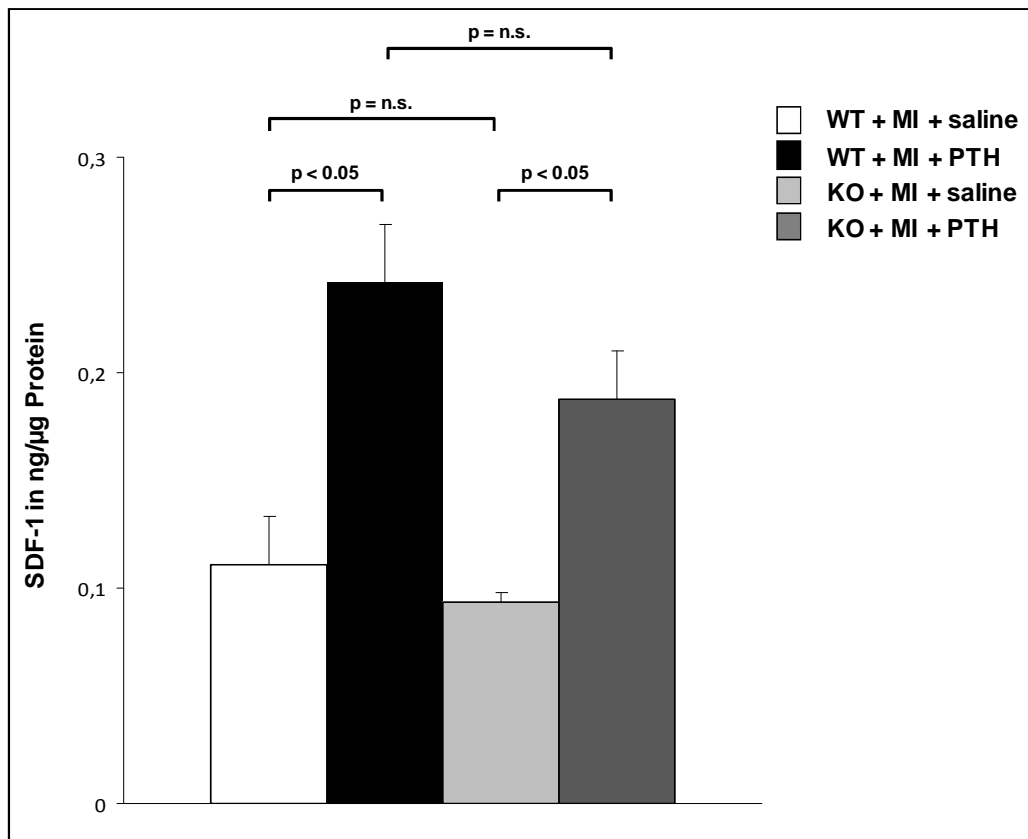


Abbildung 18

Menge an SDF-1 im Herzen in ng/μg Protein ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen

3.3 Histologie

3.3.1 PTH-Behandlung verbessert das Remodeling auch in G-CSF defizienten Tieren

Nach einem Myokardinfarkt erfährt das Herz sowohl im ischämischen als auch im gesunden Teil des Herzmuskels strukturelle Veränderungen. Diese Veränderungen werden Remodeling genannt und führen zu ventrikulärer Dilatation, Verminderung der linksventrikulären Wanddicke und Vernarbung des nekrotischen Muskelgewebes [201]. Um das Remodeling sowohl in der Frühphase als auch in der Spätphase zu untersuchen, fertigten wir histologische Schnitte 6 Tage und 30 Tage nach Induktion eines Myokardinfarkts an.

3.3.1.1 Infarktgröße

In den histologischen Schnitten an Tag 6 konnten wir sowohl in der Wildtypgruppe als auch in der G-CSF defizienten Gruppe nur eine geringe Verbesserung der Infarktgröße nach PTH-Behandlung im Vergleich zur Saline- Behandlung feststellen. Diese Veränderung zeigte sich in der Wildtypgruppe ($34 \pm 3,4$ % vs. $36,1 \pm 3,5$ %; $p=0,71$) deutlicher als in der G-CSF defizienten Gruppe ($37,5 \pm 2$ % vs. $37,1 \pm 1,9$ %; $p=0,91$).

Jedoch nach 30 Tagen, was die Spätphase des Remodelings repräsentiert, konnten wir in beiden Gruppen eine signifikante Verkleinerung des Infarktgebiets durch die PTH-Behandlung feststellen (Wildtyp: $28,1 \pm 2,5$ vs. $35,4 \pm 2$ %; $p<0,05$; G-CSF Knockout: $26,4 \pm 2,7$ % vs. $33,5 \pm 0,8$ %; $p<0,05$). Des Weiteren zeigte sich ein geringfügiger Unterschied in den Kontrollgruppen, wobei die Infarktgröße in der G-CSF defizienten Gruppe kleiner als in der Wildtypgruppe war ($26,4 \pm 2,7$ vs. $28,1 \pm 2,5$; $p=0,43$).

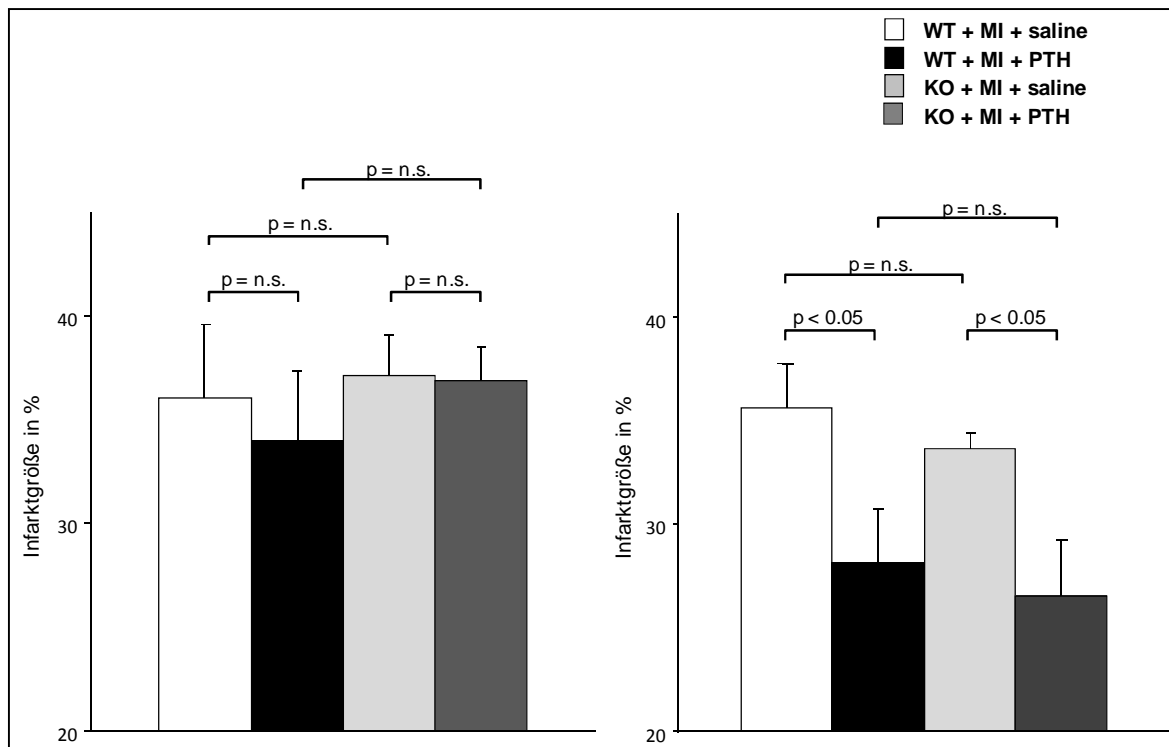


Abbildung 19

Infarktgröße in Prozent an Tag 6 (links) und Tag 30 (rechts) ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen

3.3.1.2 Linksventrikuläre Wanddicke

Die Effekte der PTH-Behandlung auf die linksventrikuläre Wanddicke an Tag 6 auf die verschiedenen Gruppen waren vergleichbar mit den Veränderungen auf die Infarktgröße. Lediglich in der Wildtyp-Gruppe war eine deutlichere Verbesserung bezüglich der linksventrikulären Wanddicke zu beobachten (Wildtyp-Gruppe: $0,6 \pm 0,07$ mm vs. $0,48 \pm 0,03$ mm; $p=0,17$).

In der 30-Tages-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Wanddicke nach PTH-Behandlung sowohl in der Wildtypgruppe als auch in der G-CSF defizienten Gruppe (Wildtyp: $0,37 \pm 0,04$ mm vs. $0,21 \pm 0,02$ mm; $p<0,05$; G-CSF Knockout: $0,35 \pm 0,03$ mm vs. $0,22 \pm 0,03$ mm; $p<0,05$). Im Vergleich zwischen den Wildtyptieren und den G-CSF defizienten Tieren ergab sich weder in der Saline-Gruppe noch in der PTH-behandelten Gruppe ein signifikanter Unterschied.

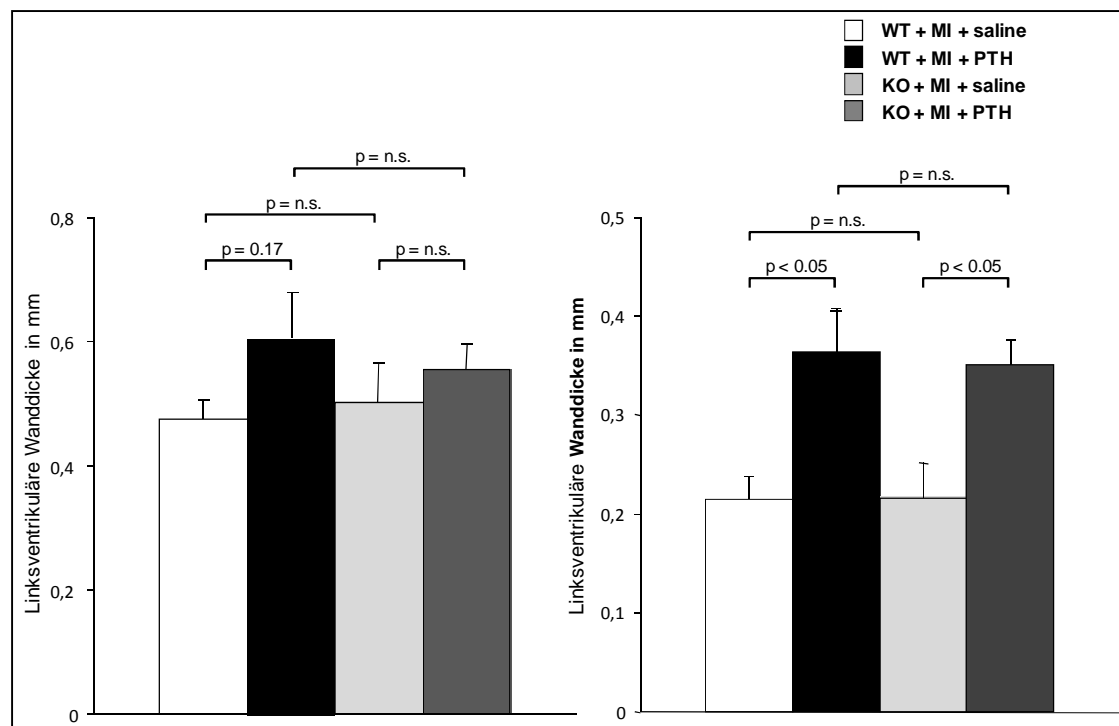


Abbildung 20

Wanddicke der Vorderwand des linken Ventrikels in mm an Tag 6 (links) und Tag 30 (rechts) ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen

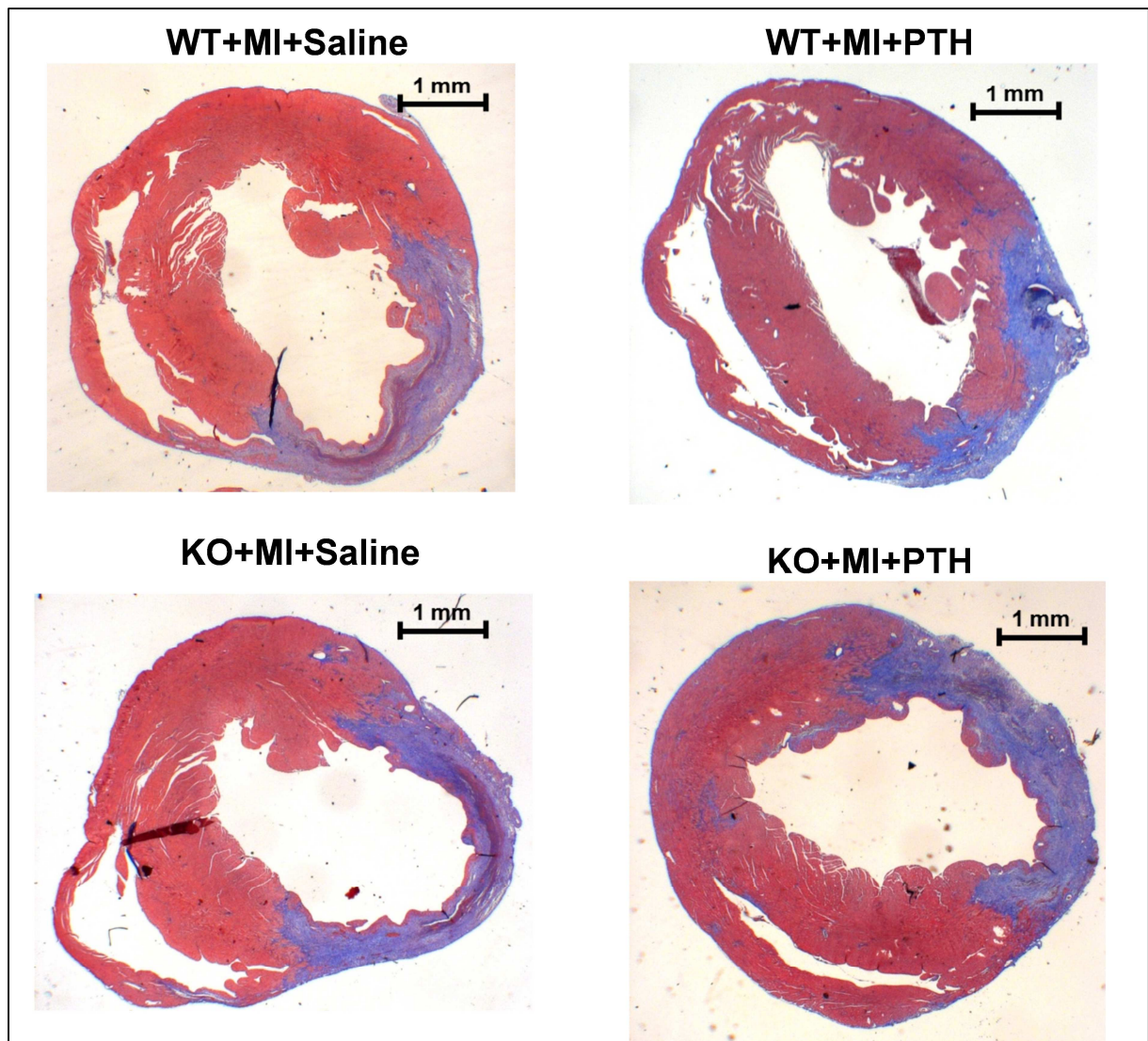


Abbildung 21

Repräsentative Schnitte zur Bestimmung der Infarktgröße und der linksventrikulären Wanddicke von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung Tag 30

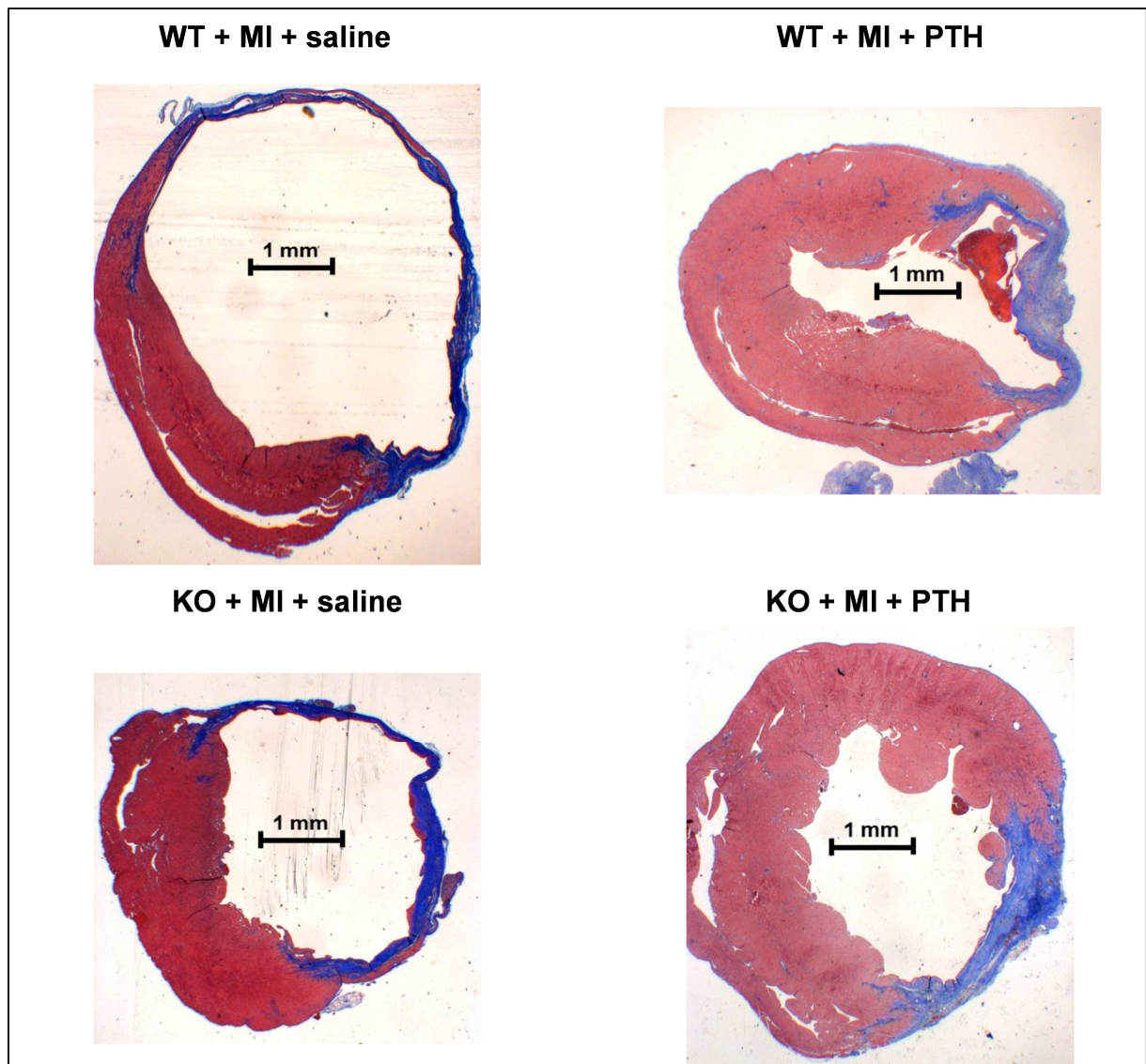


Abbildung 22

Repräsentative Schnitte zur Bestimmung der Infarktgröße und der linksventrikulären Wanddicke von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung an Tag 30

3.3.2 Endogenes G-CSF hat keinen Einfluss auf die vermehrte Neovaskularisation nach PTH-Behandlung

Um das Ausmaß der Neoangiogenese zu bestimmen, wurde eine immunhistochemische Färbung des Endothelzellmarker CD31 an Tag 6 und Tag 30 durchgeführt. Es wurden jeweils 10 high power fields (HPF; 400fache Vergrößerung) in der Periinfarktzone zufällig ausgesucht und ausgewertet.

Sowohl an Tag 6 als auch an Tag 30 zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an CD31-positiven Kapillaren nach PTH-Behandlung in der Periinfarktzone. Dieser Unterschied bestand in der Wildtyp- sowie in der G-CSF defizienten Gruppe.

Im Vergleich zwischen der Wildtyp- und den G-CSF defizienten Mäusen konnten in der Saline-Gruppe und in der PTH-behandelten Gruppe keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

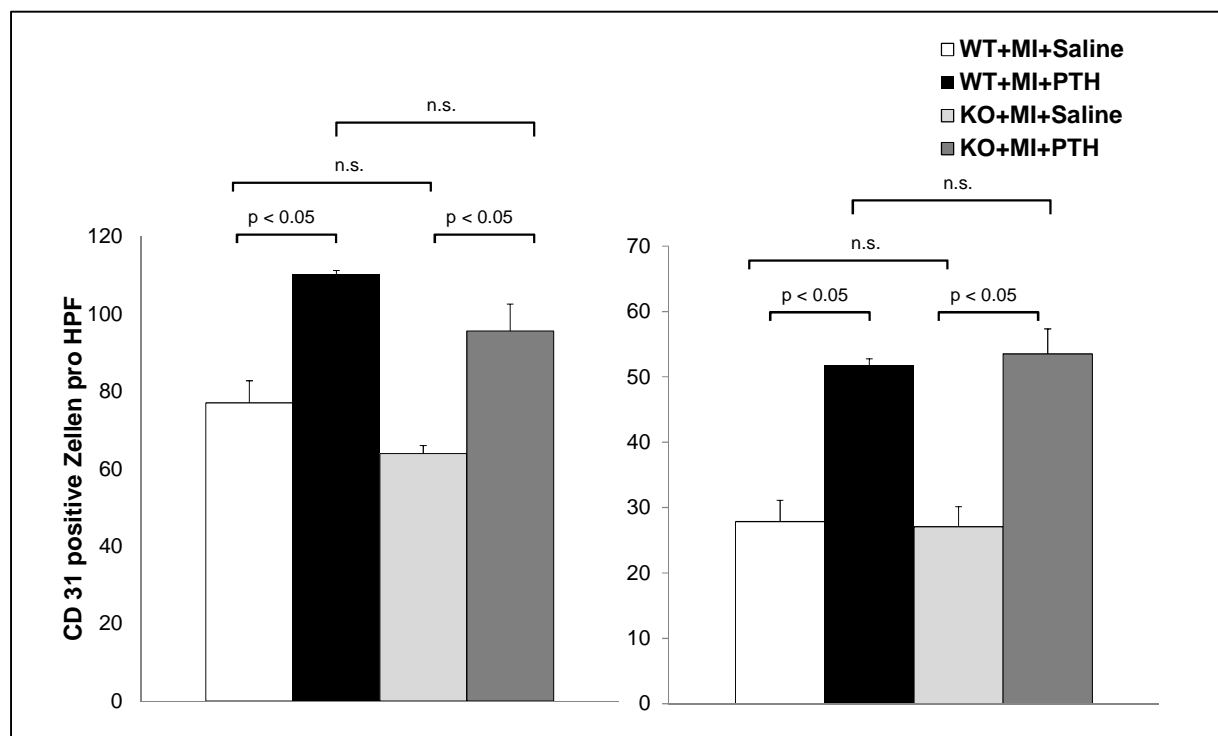


Abbildung 23

Anzahl der CD31 positiven Zellen pro HPF in den verschiedenen Gruppen; links: Tag 6; rechts: Tag 30

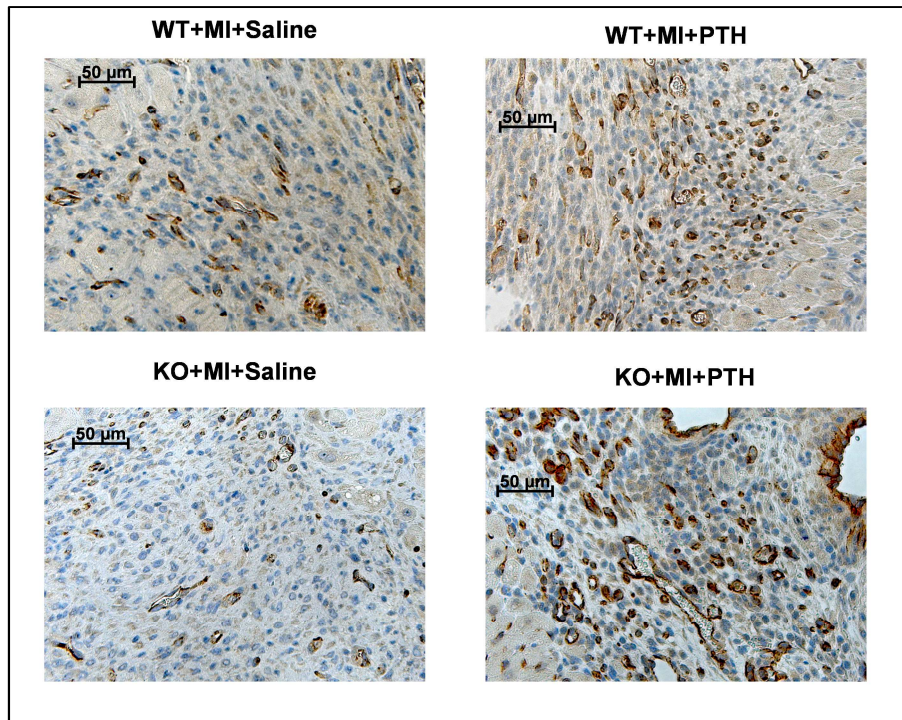


Abbildung 24: Repräsentative Bilder von CD31 positiven Zellen in der Periinfarktzone von Wildtyp- (oben) und G-CSF Knockout-Mäusen (unten) ohne Behandlung (links) und nach PTH-Behandlung (rechts) in 400facher Vergrößerung an Tag 6

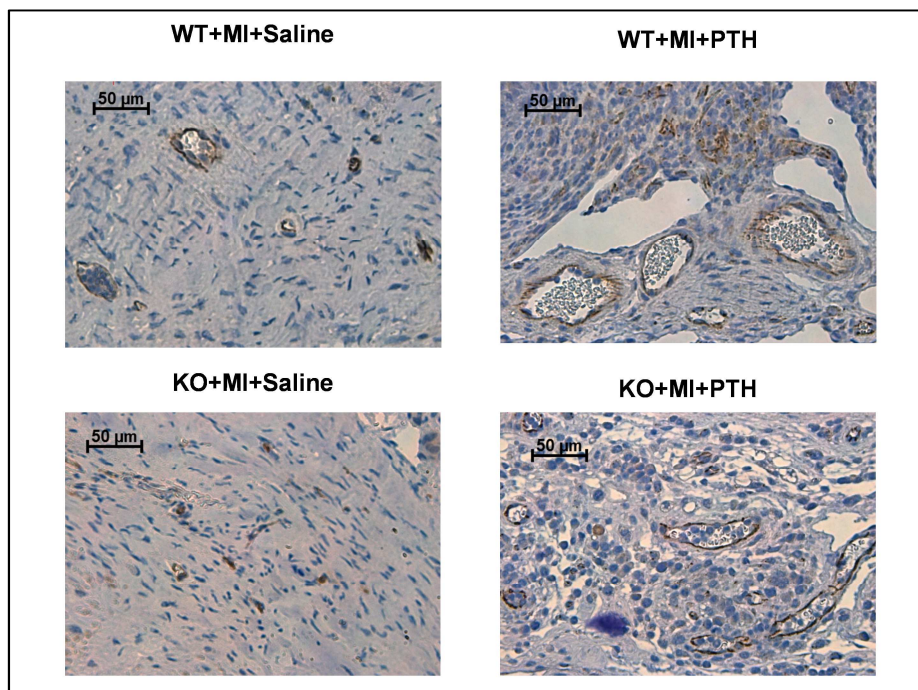


Abbildung 25: Repräsentative Bilder von CD31 positiven Zellen in der Periinfarktzone von Wildtyp- (oben) und G-CSF Knockout-Mäusen (unten) ohne Behandlung (links) und nach PTH-Behandlung (rechts) in 400facher Vergrößerung an Tag 30

3.3.3 PTH-Behandlung hat auch in G-CSF defizienten Tieren einen positiven Effekt auf die Apoptose nach Myokardinfarkt

Die apoptotischen Zellen wurden mit dem TUNEL-Assay an Tag 2 untersucht. Wiederum wurden 10 HPF an den Periinfarktzone des Myokardinfarkts zufällig ausgewählt und ausgewertet.

Es zeigte sich, dass durch die PTH-Behandlung in der Wildtyp- als auch in der G-CSF defizienten Gruppe eine signifikante Verminderung der apoptotischen Zellen in der Periinfarktzone erreicht werden konnte.

Im Vergleich zwischen der Wildtyp- und der Knockoutgruppe konnte erkannt werden, dass sowohl bei den Saline- als auch die PTH-behandelten Tieren der Wildtypgruppe eine signifikant verminderte Anzahl an apoptotischen Zellen in der Periinfarktzone vorlagen.

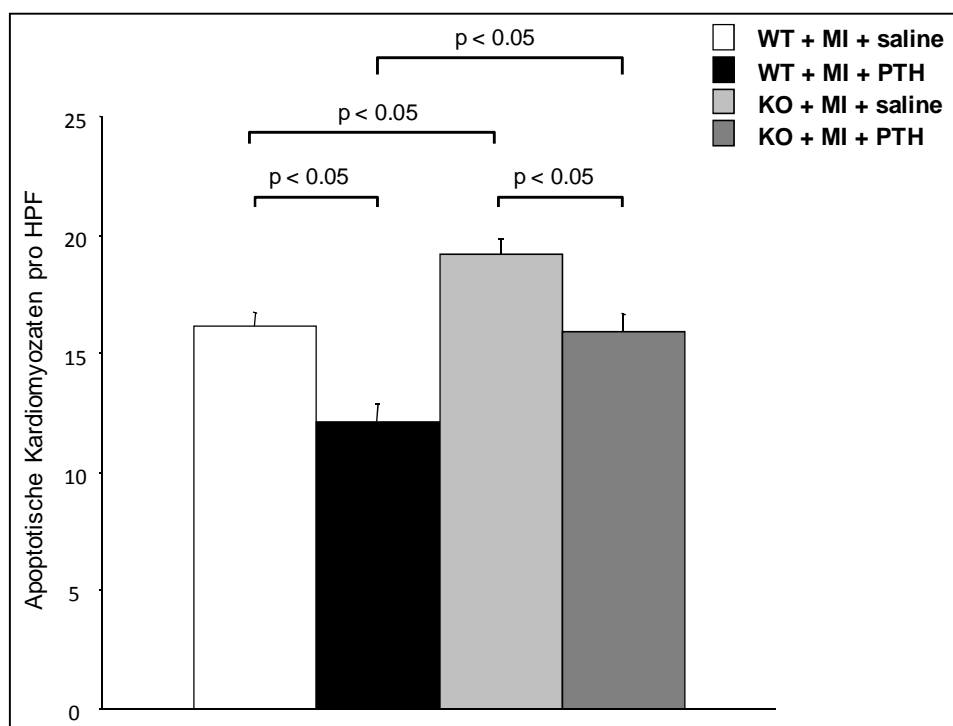


Abbildung 26

Apoptotische Kardiomyozyten an Tag 2 in der Periinfarktzone ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen

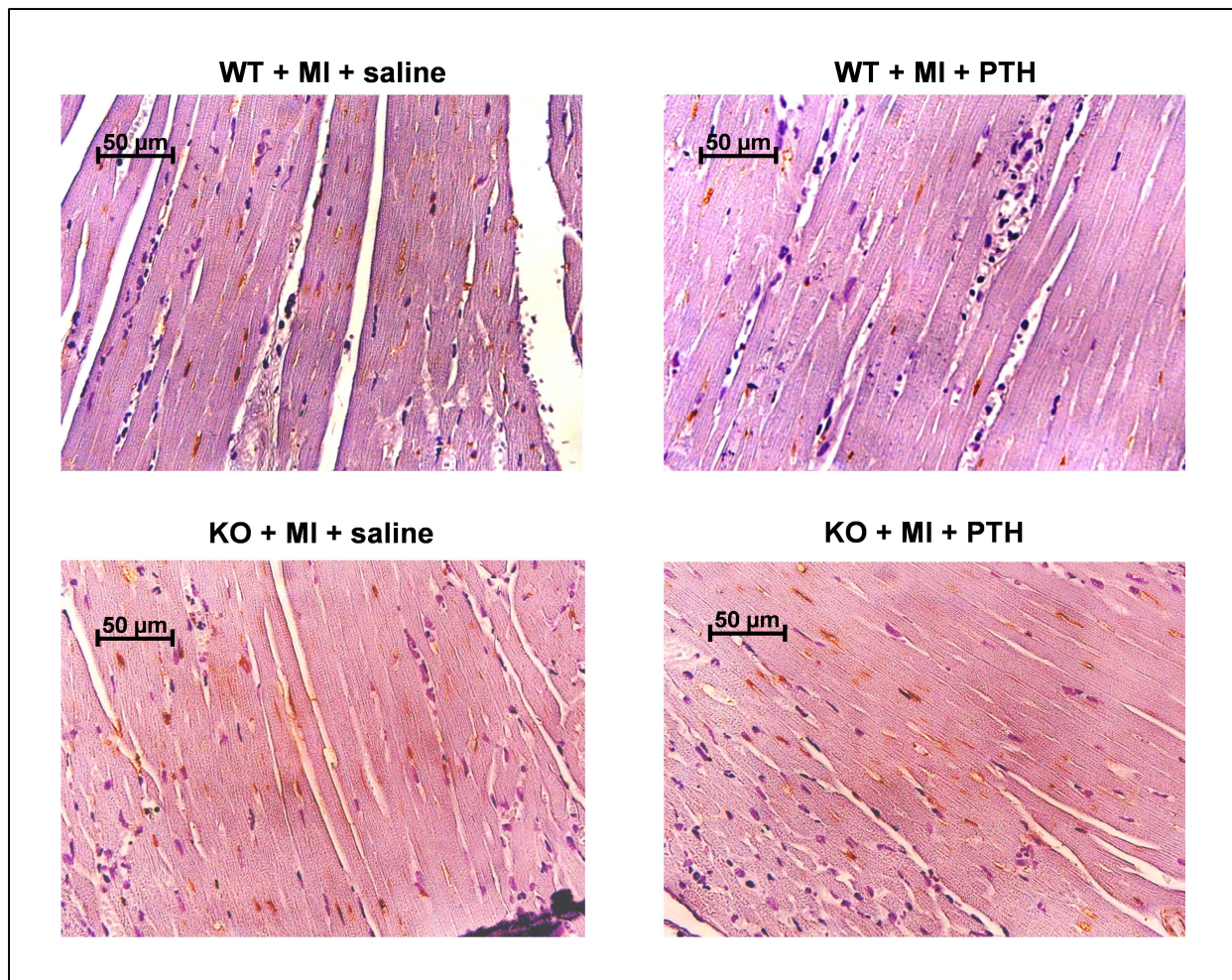


Abbildung 27

Repräsentative Bilder von apoptotischen Kardiomyozyten in der Periinfarktzone von Wildtyp- (oben) und G-CSF Knockout-Mäusen (unten) ohne Behandlung (links) und nach PTH-Behandlung (rechts) in 400facher Vergrößerung an Tag 2

3.4 Hämodynamik

Die hämodynamischen Untersuchungen wurden mit dem Millar-Tip-Katheter an Tag 6 und Tag 30 wie in 2.2.5.3.3 durchgeführt. Hierbei interessierten wir uns besonders für die systolischen Parameter. Daher betrachteten wir die Ejektionsfraktion und das Cardiac Output als Parameter der Kontraktilität des Myokards und den maximalen linksventrikulären Druck.

Tag	Parameter	Wildtyp + Saline	Wildtyp + PTH	G-CSF KO + Saline	G-CSF KO+ PTH
6	Ejektionsfraktion	28,4±5,5	43,4±4,7	25,3±5,3	35,8±2,2
	Cardiac Output	4753±873	6522±817	3408±487	5164±365
	Max. LV-Druck	51,9±21,7	74,1±1,7	50,4±11,1	75,5±11,4
30	Ejektionsfraktion	26,6±2,1	44,8±3,4	26,1±2,1	40,1±2,9
	Cardiac Output	4993±300	5884±356	4697±391	6169±414
	Max. LV-Druck	86,4±1,8	94,±2	87,8±1,9	93,5±3,5

Tabelle 5

Übersicht über die wichtigsten hämodynamischen Parameter von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung an Tag 6 und Tag 30

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen repräsentative Druck-Volumen-Kurven, die bei der Millar-Tip-Kathetermessung erhoben wurden und zur Berechnung der genannten Parameter herangezogen werden.

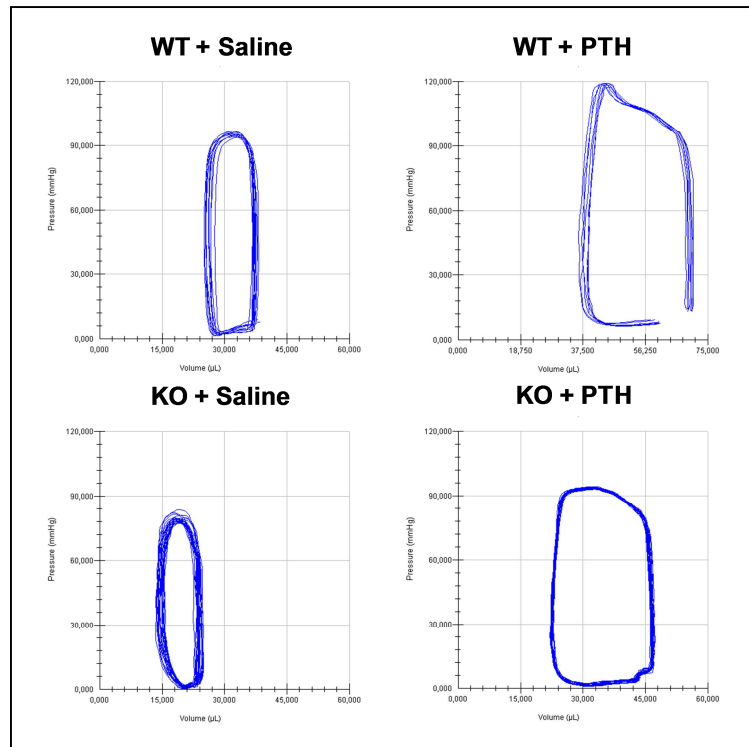


Abbildung 28: Repräsentative Druck-Volumen-Kurven von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung an Tag 6 (Abszisse: Volumen; Druck: Ordinate)

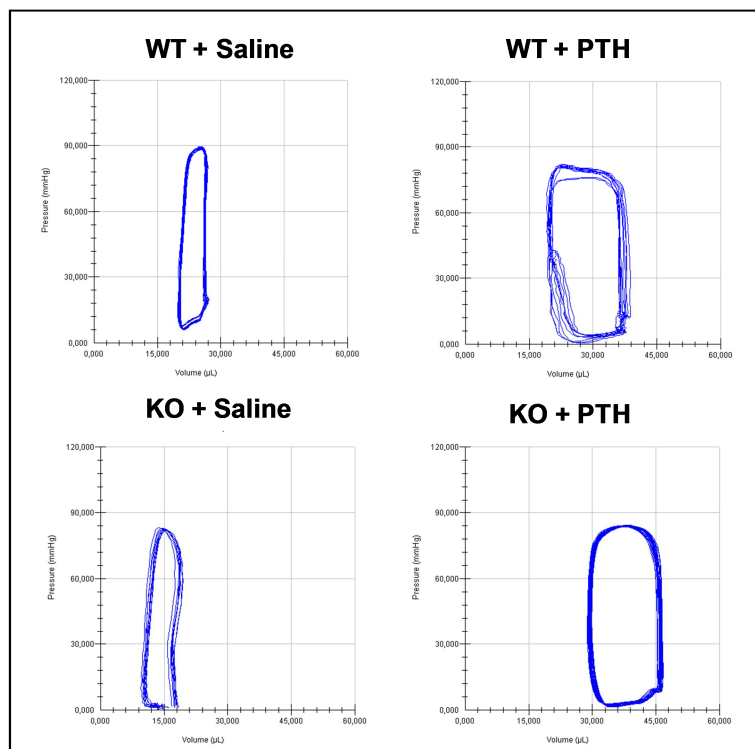


Abbildung 29: Repräsentative Druck-Volumen-Kurven von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung an Tag 30 (Abszisse: Volumen; Druck: Ordinate)

3.4.1 Ejektionsfraktion

Bei der Ejektionsfraktion sahen wir in der Wildtyp- und in der Knockout-Gruppe eine signifikante Verbesserung nach PTH-Behandlung an Tag 6 sowie an Tag 30.

Vergleich man die Wildtypgruppe und die G-CSF Knockout-Gruppe untereinander, so zeigte sich eine geringfügige Einschränkung der Ejektionsfraktion der G-CSF defizienten Tiere sowohl nach Saline- als auch nach PTH-Behandlung. Dieser nicht signifikante Unterschied war deutlicher in der PTH-behandelten Gruppe als in der Saline-behandelten Gruppe zu sehen.

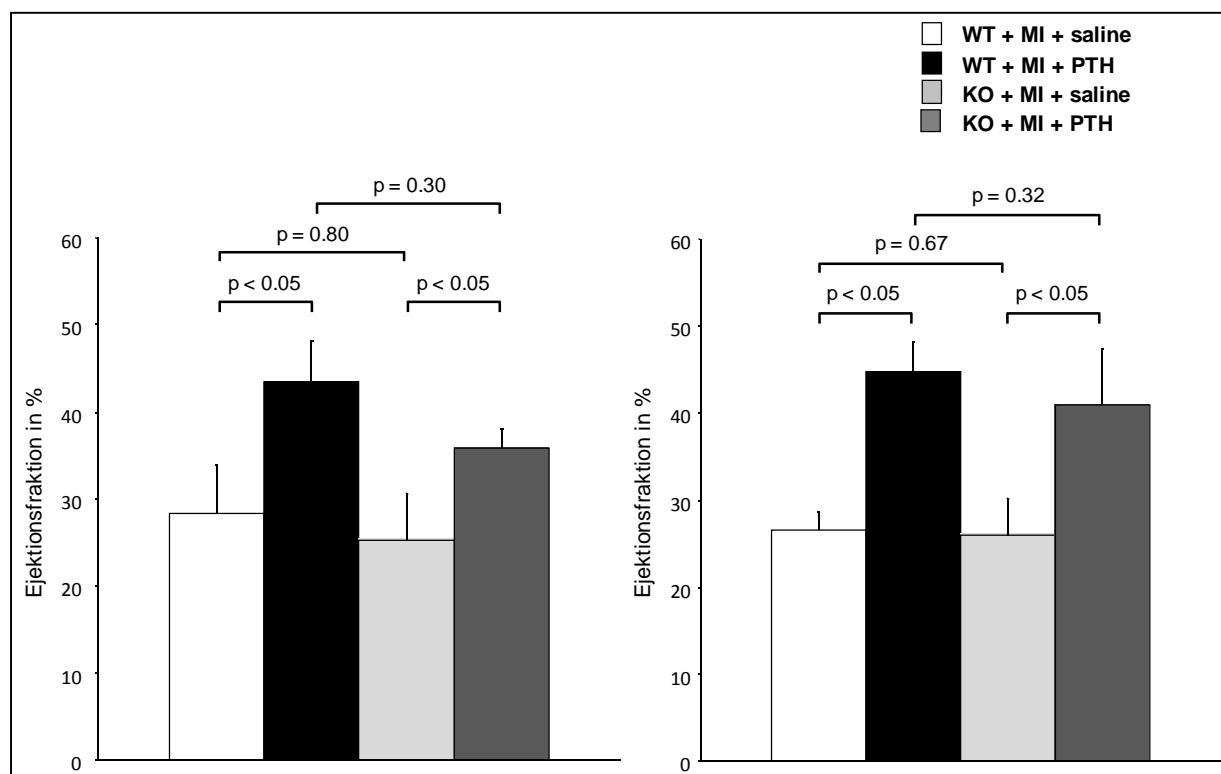


Abbildung 30

Ejektionsfraktion in Prozent von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung an Tag 6 (links) und Tag 30 (rechts)

3.4.2 Herzminutenvolumen

Ein ähnliches Bild wie bei der Ejektionsfraktion zeigte sich beim Herzminutenvolumen (Cardiac Output). Das Herzminutenvolumen verbesserte sich in den PTH-behandelten Gruppen signifikant an Tag 6 sowie an Tag 30.

Im Vergleich zwischen den Wildtyptieren und den G-CSF defizienten Tieren war an Tag 6 ein nicht signifikant höheres Herzminutenvolumen bei den Wildtyptieren zu sehen, was bei der 30-Tages-Messung nicht mehr zu erkennen war.

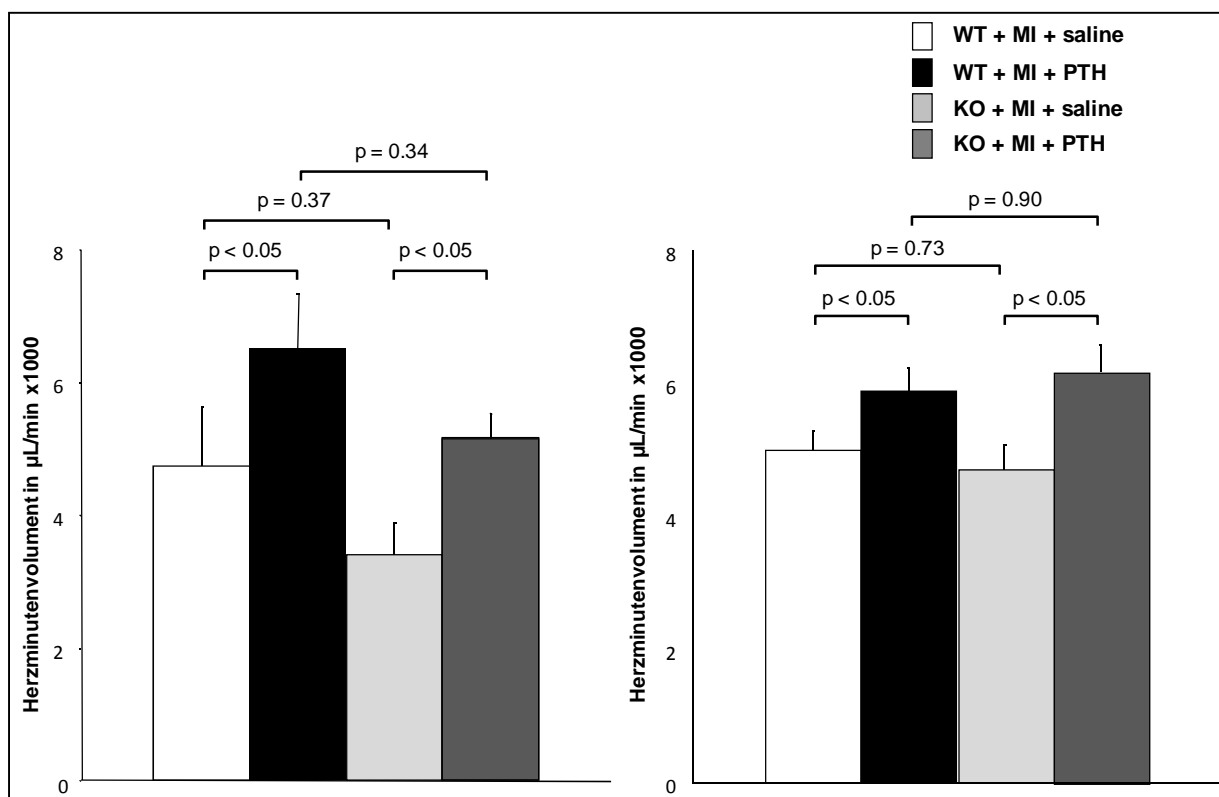


Abbildung 31

Herzminutenvolumen in µL/min von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung an Tag 6 (links) und Tag 30 (rechts)

3.4.3 Maximaler linksventrikulärer Druck

Der maximale linksventrikuläre Druck wurde an Tag 6 durch die PTH-Behandlung sowohl in der Wildtyp- als auch in der G-CSF Knockout-Gruppe verbessert (Wildtyp: $51,9 \pm 21,7$ vs. $74,1 \pm 1,7$; Knockout: $50,4 \pm 11,1$ vs. $75,5 \pm 11,4$; beide Unterschiede nicht signifikant). Zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Mäusen zeigte sich sowohl in der unbehandelten als auch in der PTH-behandelten Gruppe kein Unterschied.

An Tag 30 zeigte sich eine signifikante Verbesserung des maximalen linksventrikulären Drucks, wenn die Tiere mit PTH-behandelt wurden. Diese Verbesserung war sowohl in der Wildtyp- als auch in der Knockout-Gruppe zu sehen.

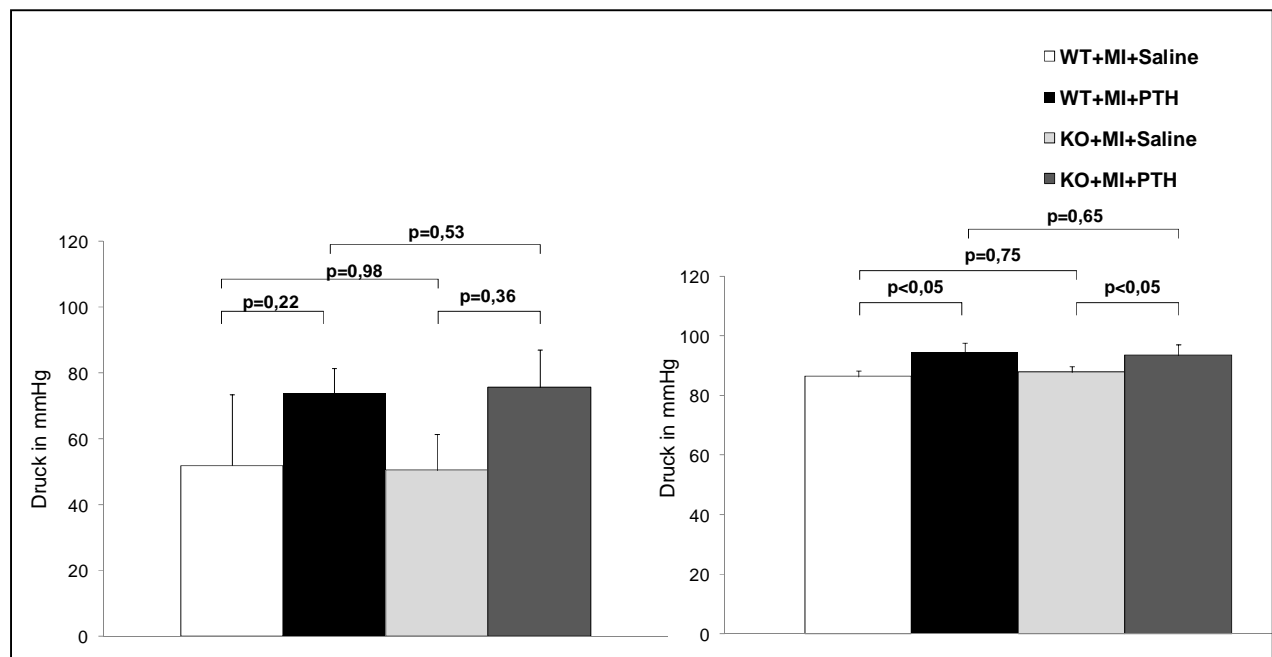


Abbildung 32

Linksventrikulärer Druck von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung an Tag 6 (links) und Tag 30 (rechts)

3.5 Überleben

Für das kumulative Überleben wurden pro Gruppe mindestens 20 Tiere operiert und nach dem beschriebenen Regime behandelt. Die Tiere wurden insgesamt über 30 Tage beobachtet.

Bei den PTH-behandelten Tieren überlebten signifikant mehr Tiere bis zum Tag 30 im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Insgesamt war das Überleben G-CSF defizienter Tiere schlechter als bei den Wildtyptieren.

Die Sterblichkeit der Tiere war in den ersten 5 Tagen am höchsten und hielt sich in der restlichen Zeit relativ gering.

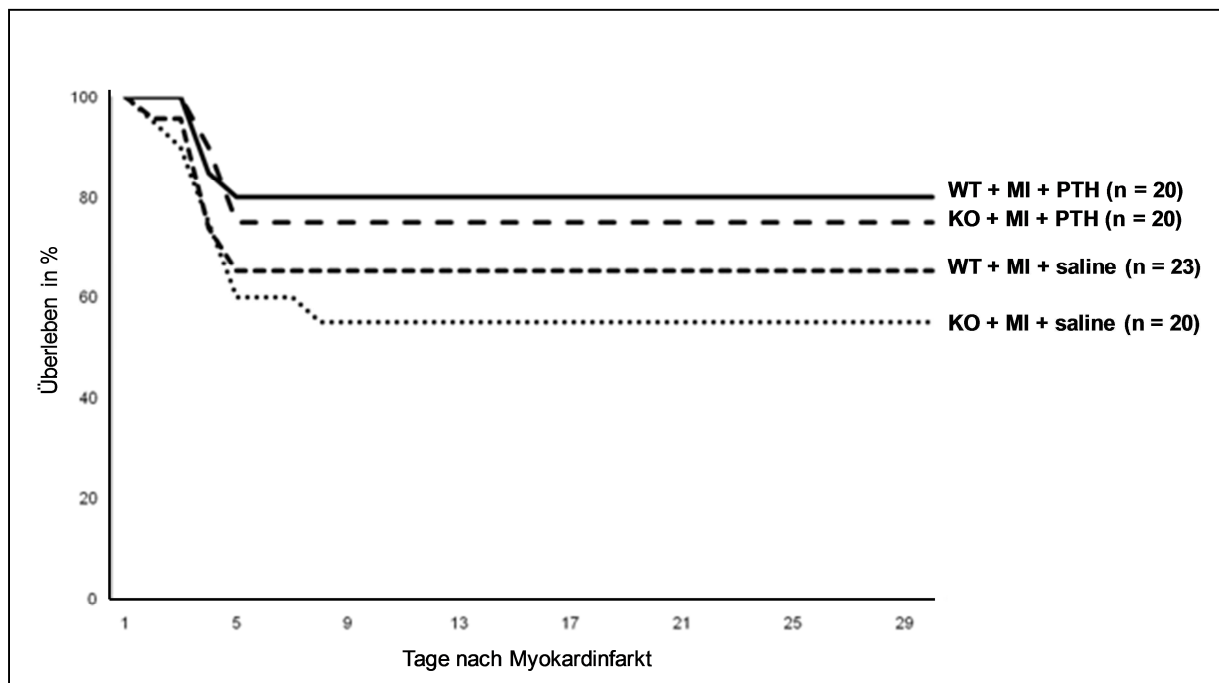


Abbildung 33

Kumulatives Überleben von Wildtyp- und G-CSF Knockout-Mäusen ohne Behandlung und nach PTH-Behandlung bis zum Tag 30

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von endogenem G-CSF auf die kardioprotektiven Effekte von PTH nach einem Myokardinfarkt untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die Mobilisation und das Homing der BMCs sowie die durch BMCs verursachten parakrinen Effekte gelegt.

Es ist bekannt, dass PTH, neben seiner Funktion bei der Regulation des Kalziumhaushalts, als intermittierende Therapie auch kardioprotektive Effekte vermittelt. Im Mausmodell resultierte eine PTH-Gabe nach Myokardinfarkt in eine Verbesserung der Funktion und des Überlebens [202]. Diese Effekte waren mit einer verbesserten Mobilisation von BMC's aus dem Knochenmark und einem verbesserten Homing der BMC's ins das ischämische Myokard verbunden [202, 203]. Brunner et al. konnten nachweisen, dass die mobilisierende Wirkung von PTH auf BMC's durch eine vermehrte Ausschüttung von endogenem G-CSF vermittelt wurde [204].

Die wesentlichen Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen zeigten folgendes:

- die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark, welche nach PTH-Gabe bei Wildtyptieren stattfindet, ist bei G-CSF defizienten Tieren nicht nachzuweisen
- SDF-1 wird auch in der G-CSF defizienten Gruppe durch PTH-Gabe stabilisiert, was zu einem verbesserten Homing von BMCs in das ischämische Myokard führt
- die PTH-Behandlung führt sowohl bei Wildtyp- als auch bei G-CSF defizienten Tieren zu einer Verbesserung der Neovaskularisation und dem Remodeling
- in beiden Gruppen zeigte sich eine Verringerung der Anzahl der apoptotischen Kardiomyozyten nach PTH-Behandlung; im Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte sich jedoch eine vermehrte Anzahl an apoptotischen Kardiomyozyten in der G-CSF defizienten Gruppe
- die schlechtere Funktion und das schlechtere Überleben der G-CSF defizienten Mäuse an Tag 6 glich sich im Langzeitverlauf an die Ergebnisse der Wildtyptiere an

4.1 Bei G-CSF defizienten Mäusen findet nach PTH-Gabe keine Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark statt

PTH steigert durch die Aktivierung von Osteoblasten, welche die Stammzellnische regulieren, die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark [30]. Die Aktivierung von Osteoblasten führt zu einem verbesserten Überleben und einer verbesserten Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen [35]. Nach PTH-Gabe steigt auch der G-CSF-Spiegel im peripheren Blut um circa das Dreifache an [204]. G-CSF wirkt mobilisierend auf BMCs durch die Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Achse in der Stammzellnische, einerseits durch Inaktivierung von SDF-1 durch CD26- [148] und MMP-9-Aktivierung [149] und andererseits durch die Abspaltung des N-Terminus von CXCR4 durch die neutrophile Elastase [147]. Dass eine PTH-Gabe mobilisierende Wirkung auf die BMCs hat, konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden [203, 204]. In einer klinischen Studie, die die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark vor autologer Stammzelltransplantation untersuchte, zeigte sich eine Mobilisation von Stammzellen durch Hinzunahme von PTH zum Therapieregime bei Patienten, bei denen eine vorherige Mobilisation mit G-CSF alleine versagt hatte [186]. In einer tierexperimentellen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an BMCs im peripheren Blut nach Gabe von PTH nachgewiesen werden. Diese Mobilisation war mit einer Verdreifachung des G-CSF-Levels im peripheren Blut verbunden und konnte durch Zugabe eines G-CSF Antikörpers verhindert werden. Somit scheint die mobilisierende Wirkung von PTH abhängig von endogenem G-CSF zu sein [204].

In dieser Arbeit wurde nun G-CSF auf genetischer Ebene ausgeschaltet. Es zeigte sich, dass die G-CSF Defizienz die mobilisierende Wirkung von PTH komplett aufhob. Weder die CD45⁺/CD34⁺-Population noch deren Subpopulationen wurden bei den G-CSF defizienten Tieren relevant aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die mobilisierende Wirkung von PTH abhängig von endogenem G-CSF ist.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der bereits genannten Arbeit unserer Arbeitsgruppe, in welcher gezeigt wurde, dass die Blockade von G-CSF durch einen Antikörper die Mobilisation der BMCs nach PTH-Gabe verhinderte [204].

4.2 Das verbesserte Homing von Stammzellen nach PTH Gabe bleibt auch bei G-CSF Defizienz erhalten

Essentieller Bestandteil der endogenen Stammzelltherapie ist das Homing der BMCs in das ischämische Myokard. Hierbei spielt die SDF-1/CXCR4-Achse eine bedeutende Rolle.

Im Rattenmodell zeigten Askari et al., dass die Injektion von SDF-1-überexprimierenden Fibroblasten 8 Wochen nach Myokardinfarkt zusammen mit einer Mobilisation von BMCs mit G-CSF zu einem vermehrten Homing und einer Verbesserung der kardialen Funktion führte [128]. Zaruba et al. untersuchten einen weniger invasiven Ansatz die Menge an SDF-1 im Myokard zu vermehren. Sowohl durch genetische als auch pharmakologische Inhibition von CD26, einem der wichtigsten Enzyme bei der Inaktivierung von SDF-1, konnte eine Stabilisierung von SDF-1 erreicht werden [169]. Dies führte zusammen mit einer Mobilisation von Stammzellen durch G-CSF (duale Stammzelltherapie) zu einem verbesserten Homing von CXCR4⁺-Stammzellen, besserem Überleben und einer verbesserten kardialen Funktion [169]. Blockiert man CXCR-4 durch einen Antikörper, werden nicht nur die Effekte auf das Homing aufgehoben, sondern auch die Effekte auf das Überleben und die Funktion. Somit konnte bestätigt werden, dass das verbesserte Homing von CXCR⁺-Stammzellen durch die CD-26-Inhibition direkt mit der Verbesserung der Funktion und des Überlebens zusammenhängt [167]. Ein bereits in der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 verwendetes Medikament, Sitagliptin, besitzt ebenfalls die Fähigkeit CD26 zu inhibieren. In einem murinen Myokardinfarktmodell konnte gezeigt werden, dass eine CD26-Inhibition durch Sitagliptin zu einer Verbesserung des Homings von Stammzellen, der kardialen Funktion sowie des Überlebens führte [205]. Eine aktuelle klinische Studie unserer Arbeitsgruppe untersucht nun die Auswirkungen einer Therapie mit G-CSF und Sitagliptin nach akutem Myokardinfarkt. In einer ersten Interims-Analyse nach Einschluss von 36 Patienten, zeigte sich nach 6 Wochen follow-up kein Hinweis auf ein mit dem Studienmedikament assoziierten Auftreten von schweren kardiovaskulären Ereignissen, wie Notwendigkeit einer erneuten Revaskularisation, erneutem Myokardinfarkt, zerebrovaskulärem Insult oder kardial bedingtem Tod [206].

In unserer Arbeitsgruppe konnte sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt werden, dass auch PTH CD26 inhibiert und das myokardiale SDF-1-Level erhöht [34]. Eine Behandlung mit PTH nach Myokardinfarkt führte zu verbessertem Homing, gesteigerter Neovaskularisation,

vermindertem Remodeling, besserer kardialer Funktion und besserem Überleben [33, 34] . In einer Studie, welche die Auswirkungen von G-CSF und Parathormon auf das Homing von BMCs in das Myokard verglich, konnte nur bei der PTH-Behandlung ein Anstieg der $\text{lin}^-/\text{sca-1}^+/\text{c-kit}^+$ -Zellen im Herzen gezeigt werden. Bei einer Kombination der beiden Stoffe fand man lediglich einen geringfügig höheren Anteil an $\text{lin}^-/\text{sca-1}^+/\text{c-kit}^+$ -Zellen im Myokard verglichen mit der alleinigen PTH-Behandlung [203]. Es muss jedoch hinzugefügt werden, dass die PTH-Gabe selbst den G-CSF-Spiegel im Serum signifikant erhöht [204].

Unsere durchflusszytometrischen Studien ergaben nun, dass, trotz der verminderten Mobilisierung von BMCs in das periphere Blut, in der G-CSF defizienten Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl an BMCs nach PTH-Gabe in das Myokard migrierten. Ein signifikant verbessertes Homing der BMCs nach PTH-Gabe zeigte sich auch in der Wildtypgruppe. Dies steht im Einklang mit dem SDF-1 Level im Myokard, das, unabhängig von endogenem G-CSF, sowohl bei den Wildtyptieren als auch den G-CSF defizienten Tieren durch PTH signifikant gesteigert wurde.

Im Vergleich zwischen den PTH-behandelten Gruppen konnte ein geringfügig verminderter Anteil an BMCs im Herzen bei der G-CSF defizienten Gruppe festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte die fehlende Mobilisierung von BMCs aus dem Knochenmark in das periphere Blut in der G-CSF defizienten Gruppe sein. Hierdurch stehen weniger BMCs für das Homing in das ischämische Myokard aus dem peripheren Blut zur Verfügung.

Interessanterweise zeigte sich bei den Kontrollgruppen ein erhöhter Anteil der BMC-Subpopulation $\text{CD34}^+/\text{CD45}^+/\text{CXCR4}^+$ in der G-CSF defizienten Gruppe. Zwar war dieser Unterschied nicht signifikant, jedoch bemerkenswert, besonders im Hinblick darauf, dass exogen appliziertes G-CSF zu einem verminderten Homing von BMCs in das ischämische Gewebe führt. Honold et al. zeigten, dass durch G-CSF-Gabe die Spaltung von CXCR-4 und dadurch eine Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Achse verursacht wurde, was zu einem verminderten Homing führte [207]. In einer Arbeit unserer Gruppe wurde nachgewiesen, dass Tiere, die nach Myokardinfarkt mit G-CSF behandelt wurden, ein vermindertes Homing vor allem der CXCR4^+ -BMCs aufzeigen [26]. Der Unterschied in den Kontrollgruppen könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch endogenes G-CSF an der Spaltung von CXCR-4 beteiligt ist.

Betrachtet man die Menge an myokardialen SDF-1 in der Wildtyp- und der G-CSF defizienten Gruppe nach PTH-Behandlung, so gab es keinen signifikanten Unterschied

zwischen den beiden Gruppen. Es ist bekannt, dass exogen appliziertes G-CSF zu einem vermehrten Abbau von SDF-1 durch eine Aktivierung der Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV/CD26) [148] und der Matrixmetalloprotease 9 (MMP-9) [149] führt und somit eine Unterbrechung der SDF-1/CXCR-4-Achse verursacht. Auch die PTH-Gabe führt durch eine endogene Freisetzung zu einem erhöhten G-CSF-Serumspiegel [204]. Anhand unserer Daten führt diese endogene Freisetzung von G-CSF aber nicht zu einem signifikanten Abbau von SDF-1.

Es kann zusammengefasst werden, dass die Mobilisation der BMCs aus dem Knochenmark nur einen geringen Beitrag zu dem Anteil der BMCs leistet, der schließlich in das ischämische Myokard migriert. Vielmehr wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Beeinflussung des Homings, in diesem Fall mittels einer Stabilisierung der SDF-1/CXCR-4-Achse durch die CD26-Inhibition durch PTH, eine Schlüsselrolle bei der endogenen Stammzelltherapie spielt.

4.3 Die positiven Effekte von PTH auf die Neovaskularisation und das Remodeling werden nicht von endogenem G-CSF beeinflusst

Wie bereits beschrieben, ist nach aktueller Meinung weniger die Transdifferenzierung der in das Herz migrierten BMCs zu Kardiomyozyten für die positiven Effekte der Stammzelltherapie verantwortlich, sondern eher parakrine Effekte wie vermehrte Neovaskularisation, eine verminderte Apoptose und ein verbessertes Remodeling.

In einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit PTH nach Myokardinfarkt ein verbessertes Remodeling herbeiführt, was mitunter auf eine verbesserte Neovaskularisation zurückzuführen ist. Diese verbesserte Neovaskularisation war mit einer erhöhten Expression von VEGF verbunden [33]. Unklar ist, ob diese erhöhte Expression ein direkter Effekt von PTH oder ein parakriner Effekt der migrierten CD34⁺ Zellen ist. Bekannt ist, dass die Transplantation von CD34⁺ Zellen in die Infarktgrenzzone die Neovaskularisation verbessert und dass CD34⁺ Zellen durchaus verschiedene Wachstumsfaktoren beherbergen, die die Neoangiogenese beeinflussen [208, 209]. Huber et al. zeigten in einem Vergleich einer PTH- und G-CSF-Gabe nach Myokardinfarkt, dass PTH im Gegensatz zu G-CSF zu einer signifikanten Verminderung des Perfusionsdefektes und der Infarktgröße führte, wobei eine Kombination der beiden Stoffe keine additive Wirkung hatte [203]. Im Gegensatz hierzu stehen Ergebnisse einer Studie, die die Mobilisation von Progenitorzellen durch G-CSF sowie PTH und deren Einfluss auf eine

Hinterlauf-Ischämie untersuchte. Hier zeigte sich lediglich in der Kombinationsgruppe von PTH mit G-CSF, jedoch nicht in der alleinig mit PTH behandelten Gruppe, eine verbesserte Neovaskularisation. Analog hierzu zeigte sich in der Kombinationsgruppe sowie der alleinig mit G-CSF, aber nicht in der alleinig mit PTH behandelten Gruppe, eine vermehrte Expression von VEGF und Angiopoetin-1 im ischämischen Muskel [210].

In unserer Studie zeigte sich nach PTH- Behandlung sowohl in der Wildtyp- als auch in der G-CSF defizienten Gruppe eine signifikante Verminderung der Infarktgröße, eine Verbesserung der linksventrikulären Wanddicke und eine vermehrte Anzahl an CD31+ Zellen in der Periinfarktzone.

Die Anzahl der CD31+ Zellen in der G-CSF Knockout-Gruppe war im Vergleich zur Wildtypgruppe geringfügig vermindert, was in Einklang zu den durchflusszytometrischen Ergebnissen steht, in denen sich in der G-CSF-defizienten Gruppe eine geringfügig verminderte Anzahl an BMCs im Herzen zeigte. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Migration der BMCs eine große Rolle bei der Verbesserung des kardialen Remodeling nach einer Ischämie spielt. Auch eine Transplantation von CD34+ Zellen zeigte eine vermehrte Neovaskularisation sowie eine verminderte Apoptose nach einem Myokardinfarkt [71, 208, 211]. Die Verbesserung des Homing von BMCs durch DPP-IV Inhibition führte zu einer verbesserten Neovaskularisation und einer verminderten Apoptose nach Myokardinfarkt [169, 212].

4.4 Bei den G-CSF defizienten Tieren zeigte sich im Vergleich mit den Wildtyptieren eine vermehrte Anzahl an apoptotischen Kardiomyozyten

Sowohl in der Wildtyp- als auch in der G-CSF defizienten Gruppe zeigte sich eine Verminderung der apoptotischen Zellen, wenn die Tiere nach Infarktinduktion mit PTH behandelt wurden. Dieser antiapoptotische Effekt von PTH ist durch verschiedene Mechanismen zu erklären.

Einerseits ist bekannt, dass in das ischämische Myokard migrierten Stammzellen durch parakrine Effekte die Apoptose beeinflussen. Wie bereits oben beschrieben führte die Transplantation von CD34+ Zellen zur vermehrten Neovaskularisation. Hierdurch kommt es durch die verbesserte Versorgung des Infarktgrenzzonengebietes mit Nährstoffen sowie

Sauerstoff zu einer verminderten Apoptose der hypertrophierten Herzmuskelzellen im Infarktzonengrenzgebiet [71].

Andererseits aktiviert die Bindung von SDF-1 und CXCR4 auf endothelialen Zellen sowie Kardiomyozyten über eine G-Protein-vermittelte Kaskade die Proteinkinase B, die eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus innehat. Eine intrakardiale Injektion von SDF-1 hatte eine signifikante Verminderung der Apoptose 72 Stunden nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell zur Folge [213]. Wie bereits beschrieben ist Parathormon ein Inhibitor der CD26 und hemmt somit den Abbau von SDF-1 zu seiner inaktiven Form [34]. Durch die PTH-Behandlung wird somit die Menge an aktivem SDF-1 im Myokard gesteigert, was einen positiven Einfluss auf das apoptotische Verhalten der Zellen nach Myokardinfarkt hat.

Jedoch zeigte sich bei dem Vergleich der Wildtyp- und G-CSF defizienten Gruppe, sowohl ohne als auch mit PTH-Behandlung, eine signifikant erhöhte Anzahl an apoptotischen Kardiomyozyten in der G-CSF defizienten Gruppe. Harada et al. untersuchten bereits 2005 den Einfluss von G-CSF auf Kardiomyozyten in vitro sowie in vivo. In dieser Studie zeigte sich, dass die Bindung von G-CSF an den auf Kardiomyozyten exprimierten G-CSF Rezeptor zu einer verminderten Apoptose über eine Aktivierung des JAK/STAT Signalweges führt. Die hierdurch aktivierte Transkription antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 könnte ein Grund für diese Wirkung von G-CSF sein. In einem murinen LAD-Ligationsmodell sah man signifikant weniger apoptotische Kardiomyozyten unter G-CSF Behandlung. Bei STAT3-Knockout-Mäusen hatte die G-CSF Behandlung keinen Einfluss auf die Apoptose, was für einen direkten Effekt von G-CSF über STAT auf die Apoptose spricht [158]. Andererseits zeigte sich in den G-CSF defizienten Tieren eine nicht signifikant geringere Zahl an migrierten BMCs, was wiederum einen Einfluss auf das apoptotische Verhalten des ischämischen Myokards hat.

4.5 Die kardiale Funktion sowie das Überleben im Langzeitvergleich nach Myokardinfarkt wird nicht durch die G-CSF Defizienz beeinflusst

In der Hämodynamik als auch der Mortalität zeigte sich ein von G-CSF unabhängiger positiver Effekt der PTH Behandlung nach Myokardinfarkt. Sowohl in der Wildtyp- als auch der G-CSF-defizienten Gruppe zeigte sich analog zu den beschriebenen parakrinen Effekten eine verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion, Herzminutenvolumen und ein höherer

maximaler linksventrikulärer Druck nach Applikation von PTH. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtyp- und der GCSF Knockout-Gruppe. Erwähnenswert jedoch ist, dass sich an Tag 6 nach Myokardinfarkt, eine geringfügig schlechtere myokardiale Funktion der Knockout-Gruppe in den hämodynamischen Untersuchungen zeigte. Dies resultierte des Weiteren in ein schlechteres Überleben dieser Tiere. Eine Erklärung hierfür könnten sowohl die direkten antiapoptotischen Effekte von G-CSF [158] als auch die verminderte Anzahl an migrierten BMCs und deren bereits beschriebenen Effekte auf die Neovaskularisation sowie die Apoptose sein. 30 Tage nach Infarkt konnte kein Unterschied mehr zwischen den Wildtyp- sowie den Knockout-Tieren nachgewiesen werden.

In einer stichprobenartigen Obduktion der Tiere zeigte sich in allen Fällen eine Ventrikelruptur als Todesursache der Mäuse. Da die PTH-Behandlung wie bereits oben beschrieben positiven Einfluss auf das Remodeling und somit die Stabilität der Ventrikelwand nimmt, könnte dies eine Erklärung für das verbesserte Überleben der Mäuse unter PTH-Therapie sein.

4.6 Limitationen der Arbeit

In dieser Arbeit wurde im Tiermodell untersucht, wie sich eine G-CSF Defizienz auf die Effekte von PTH nach einem Myokardinfarkt auswirkt. Es wurde besonders das Verhalten von BMCs bezüglich der Mobilisation und des Homings untersucht. Inwieweit sich die G-CSF Defizienz und die damit einhergehende verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut [188] auf das Infarktgeschehen auswirkt, wurde hier nicht berücksichtigt.

Zur Infarktinduktion wurde die LAD-Ligation als bereits gut etablierte Methode in der Grundlagenforschung verwendet [214]. Diese Methode spiegelt jedoch nur bedingt die pathologischen Vorgänge wider, die bei einem Myokardinfarkt beim Menschen in krankhaft veränderten Koronarien ablaufen. So wird in dieser Arbeit nicht berücksichtigt in welchem Maße die kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Nikotinabusus die positiven Effekte der PTH-Behandlung beeinflussen. Des Weiteren entsteht der Myokardinfarkt typischerweise durch eine Ruptur eines Plaques und eine konsekutive Thrombose durch Freisetzung prokoagulatorischer Stoffe. Auch der Einfluss dieser Vorgänge wurde nicht berücksichtigt.

Im klinischen Alltag ist die wichtigste Therapie des akuten Myokardinfarkts die Revaskularisation des ischämischen Myokards mittels perkutaner Koronarintervention oder Bypassoperation. In dem hier verwendeten Modell kann jedoch lediglich eine Aussage über die Wirkung von PTH auf eine chronische Ischämie getroffen werden.

4.7 Parathormon als Therapieoption nach Myokardinfarkt – ein Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten einen, von der Mobilisation der BMCs weitgehend unabhängigen, positiven Effekt von Parathormon auf das Remodeling, die Pumpfunktion sowie das Überleben nach Myokardinfarkt im Tiermodell. Es konnte nicht endgültig geklärt werden, auf welche Weise PTH Einfluss auf diese Geschehen nimmt. Es zeigte sich ein vermehrtes Homing von BMCs durch eine Stabilisierung der CXCR-4/SDF-1-Achse, was sicherlich über parakrine Effekte einen gewissen Anteil an den positiven Effekten der PTH-Gabe hat. Eine multizentrische doppelt-geblindete klinische Studie, die den Einfluss der Stabilisierung der CXCR-4/SDF-1-Achse mittels Sitagliptin und eine Mobilisierung von Stammzellen mittels G-CSF nach akutem Myokardinfarkt untersucht wird aktuell an unserer Klinik durchgeführt (Safety and efficacy of SITAgliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor; SITAGRAMI-Studie).

Ob PTH über die verschiedenen PTH-Rezeptoren auch einen direkten Effekt auf das ischämische Geschehen nach Myokardinfarkt nimmt, war nicht Bestandteil dieser Arbeit. Studien, die diese Effekte von PTH näher untersuchen, sind essentiell, um ein besseres Verständnis über die Mechanismen der PTH-Therapie zu erlangen und somit den klinischen Einsatz von PTH zu ermöglichen. Zielführend sind hier sicherlich Versuche mit genetisch veränderten Tieren, welchen der PTH-Rezeptor fehlt.

PTH (bzw. Teriparatid) ist bereits seit 2003 für die Behandlung der schweren Osteoporose in der Klinik zugelassen. Bisher hat sich bei dieser Therapie kein Hinweis auf kardiovaskuläre Nebenwirkungen der intermittierenden PTH-Gabe gezeigt, sodass von einer Sicherheit dieser Therapie auszugehen ist. In einer kürzlich veröffentlichten Phase-2-Studie über die Mobilisierung von Stammzellen für die autologe Stammzelltransplantation, zeigte sich bei circa 40 % der Patienten, bei denen eine vorherige Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen mit G-CSF fehlgeschlagen war, eine ausreichende Mobilisierung unter Hinzunahme von PTH [186]. Ob die alleinige PTH-Gabe beim Menschen eine mobilisierende Wirkung hat ist bisher noch nicht erforscht. In einem ersten Schritt sollte deswegen zunächst die Wirkung einer alleinigen Gabe von PTH auf die Stammzellmobilisation in einer klinischen Studie untersucht werden. Sollte sich hier eine Mobilisation der Stammzellen zeigen, wäre eine weitere Dosisfindungsstudie nötig, um die optimale Dosis für die Mobilisation von Stammzellen zu evaluieren und die besten

Voraussetzungen für eine Studie über den klinischen Einsatz von PTH bei der Therapie der ischämischen Kardiomyopathie zu schaffen.

5 Zusammenfassung

Die koronare Herzerkrankung und besonders der daraus resultierende Myokardinfarkt sind die häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Durch eine Behandlung der kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich in den vergangenen Jahren insgesamt ein selteneres Auftreten dieser Erkrankung. Die Verbesserungen der Notfallversorgung des akuten Myokardinfarkts durch perkutane Koronarinterventionen konnten die Langzeitergebnisse nach Myokardinfarkt deutlich verbessern. Jedoch entwickelt weiterhin ein Großteil der Patienten trotz optimaler medikamentöser sowie interventioneller Therapie eine ischämische Kardiomyopathie.

Seit mehreren Jahren wird nun der Ansatz der Stammzelltherapie untersucht, um die kardiale Funktion sowie das Überleben nach einem Myokardinfarkt zu verbessern. Hierbei spielen besonders die parakrinen Effekte dieser Zellen auf die Neovaskularisation, die Apoptose sowie das Remodeling eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass verschiedene Stoffe Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisieren (z.B. G-CSF) und diese Zellen dem ischämischen Reiz folgend in das Herz migrieren. Leider konnten die positiven Ergebnisse einiger Studien, die eine G-CSF Gabe im Tiermodell untersuchten, nicht in klinischen Studien reproduziert werden. Ein möglicher Grund für die negativen Ergebnisse der Studien könnte die Induktion von CD26 sowie der Abbau von CXCR-4 durch exogen appliziertes G-CSF sein. Die SDF-1/CXCR4-Achse spielt eine essentielle Rolle bei der Migration von Zellen in ischämisches Gewebe. Dieser Vorgang wird Homing genannt und ist grundlegend für die parakrinen Effekte der Stammzellen. Daher wurden weitere Agenzien untersucht, die eine mobilisierende Wirkung auf Stammzellen haben.

Parathormon ist bekannt für seine Beteiligung an der Calciumhomöostase des Körpers. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch sowohl in tierexperimentellen sowie klinischen Studien ein Einfluss von PTH auf die Mobilisation sowie das Homing von Stammzellen. In einer Arbeit unserer Gruppe zeigten sich nach Applikation von PTH nach Induktion eines Myokardinfarkts im Mausmodell eine Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark sowie ein vermehrter Anteil an Stammzellen im Myokard. Dies führte durch eine verbesserte Neovaskularisation zu einer besseren Funktion sowie einem besseren Überleben. Die Mobilisation war mit einem signifikanten Anstieg von G-CSF im peripheren Blut verbunden und konnte durch eine pharmakologische Blockade von G-CSF mittels Antikörper verhindert

werden. Neben dem Einfluss auf die Mobilisation von Stammzellen zeigte sich, dass Parathormon CD26 inhibiert und somit zu einer Stabilisation der SDF-1/CXCR4-Achse führt.

In dieser Arbeit wurde nun der Einfluss von endogenem G-CSF auf die kardioprotektiven Effekte von PTH nach Myokardinfarkt in einem transgenen G-CSF-defizienten Mausmodell untersucht. Es zeigte sich analog zu der pharmakologischen Blockade von G-CSF eine aufgehobene Mobilisation bei den G-CSF defizienten Tieren. Trotz der aufgehobenen Mobilisation der Knochenmarksstammzellen, zeigten sich sowohl in der Wild- als auch in der Knockout-Gruppe signifikant mehr CD45+/CD34+Zellen im Myokard nach PTH-Gabe. Dieses verbesserte Homing der Stammzellen steht im Einklang mit einem signifikant größeren Anteil an SDF-1 im Myokard in den mit PTH behandelten Gruppen. In der histologischen Untersuchung der Herzen zeigte sich eine Verbesserung der Neovaskularisation, eine geringere Apoptose sowie ein verbessertes Remodeling. Dies spiegelte sich in der verbesserten Hämodynamik sowie dem besseren Überleben der PTH-behandelten Tiere wieder. Es kann somit geschlossen werden, dass die Verbesserung des Homings von Stammzellen, in unserem Fall durch eine Stabilisierung der SDF-1/CXCR4-Achse, maßgebenden Anteil an dem Erfolg der endogenen Stammzelltherapie hat. PTH ist daher aufgrund der sowohl mobilisierenden Wirkung als auch des stabilisierenden Einflusses auf die SDF-1/CXCR4-Achse, was sich positiv auf das Homing der Stammzellen in ischämisches Gewebe auswirkt, ein vielversprechendes Therapeutikum in der endogenen Stammzelltherapie. Welchen direkten Einfluss eine intermittierende Gabe von PTH auf die Apoptose, Neovaskularisation sowie das Remodeling nach Myokardinfarkt hat bleibt Gegenstand zukünftiger Studien.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt Deutschland, *Todesursachen in Deutschland 2009*. 2010.
2. WHO, *World Health Statistics*. 2011.
3. Statistisches Bundesamt Deutschland, *Gesundheit - Krankheitskosten 2002, 2004, 2006 und 2006*, 2010.
4. Topol, E.J., *Validation of the early open infarct vessel hypothesis*. The American journal of cardiology, 1993. 72(19): p. 40G-45G.
5. *[GUSTO (Global Utilization of Streptokinase & t-PA for Occluded Coronary Arteries): comparison of four therapeutic strategies in acute myocardial infarction. Washington, 30 April 1993]*. Der Internist, 1993. 34(7 Suppl): p. 1-12.
6. Pfeffer, M.A., et al., *Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction*. The New England journal of medicine, 1988. 319(2): p. 80-6.
7. Brilla, C.G., et al., *Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix*. European heart journal, 1993. 14 Suppl J: p. 57-61.
8. Sharpe, N., et al., *Treatment of patients with symptomless left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. Lancet, 1988. 1(8580): p. 255-9.
9. Faris, R., et al., *Current evidence supporting the role of diuretics in heart failure: a meta analysis of randomised controlled trials*. International Journal of Cardiology, 2002. 82(2): p. 149-58.
10. Ryden, L., et al., *A double-blind trial of metoprolol in acute myocardial infarction. Effects on ventricular tachyarrhythmias*. The New England journal of medicine, 1983. 308(11): p. 614-8.
11. Friedman, L.M., et al., *Effect of propranolol in patients with myocardial infarction and ventricular arrhythmia*. Journal of the American College of Cardiology, 1986. 7(1): p. 1-8.
12. *Timolol-induced reduction in mortality and reinfarction in patients surviving acute myocardial infarction*. The New England journal of medicine, 1981. 304(14): p. 801-7.
13. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. The New England journal of medicine, 1999. 341(10): p. 709-17.

14. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. The New England journal of medicine, 2003. 348(14): p. 1309-21.
15. Cicoira, M., et al., *Long-term, dose-dependent effects of spironolactone on left ventricular function and exercise tolerance in patients with chronic heart failure*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. 40(2): p. 304-10.
16. *Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group*. The New England journal of medicine, 1998. 339(19): p. 1349-57.
17. Sacks, F.M., et al., *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators*. The New England journal of medicine, 1996. 335(14): p. 1001-9.
18. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet, 1994. 344(8934): p. 1383-9.
19. Organtransplantation, D.S., *Organspende und Transplantation in Deutschland 2010*. 2011.
20. Assmus, B., et al., *Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2006. 355(12): p. 1222-32.
21. Dimmeler, S., A.M. Zeiher, and M.D. Schneider, *Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair*. The Journal of clinical investigation, 2005. 115(3): p. 572-83.
22. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. N Engl J Med, 2003. 348(7): p. 593-600.
23. Jansen, J., et al., *Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood*. J Cell Mol Med, 2005. 9(1): p. 37-50.
24. Abdel-Latif, A., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Am Heart J, 2008. 156(2): p. 216-226 e9.
25. Engelman, M.G., et al., *Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. 48(8): p. 1712-21.

26. Brunner, S., et al., *G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells*. Experimental hematology, 2008. 36(6): p. 695-702.
27. Honold, J., et al., *Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006. 26(10): p. 2238-43.
28. Christopherson, K.W., 2nd, et al., *G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells*. Exp Hematol, 2006. 34(8): p. 1060-8.
29. Brown, E.M., *Mechanisms underlying the regulation of parathyroid hormone secretion in vivo and in vitro*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1993. 2(4): p. 541-51.
30. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. 425(6960): p. 841-6.
31. Brunner, S., et al., *Primary hyperparathyroidism is associated with increased circulating bone marrow-derived progenitor cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 293(6): p. E1670-5.
32. Brunner, S., et al., *Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow*. Exp Hematol, 2008. 36(9): p. 1157-66.
33. Zaruba, M.M., et al., *Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival*. Cardiovasc Res, 2008. 77(4): p. 722-31.
34. Huber, B.C., et al., *Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4+ stem cells into the ischaemic heart*. Cardiovascular research, 2011. 90(3): p. 529-37.
35. Taichman, R.S. and S.G. Emerson, *Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1994. 179(5): p. 1677-82.
36. Zhu, J. and S.G. Emerson, *A new bone to pick: osteoblasts and the haematopoietic stem-cell niche*. Bioessays, 2004. 26(6): p. 595-9.
37. Strydom, H.C., *Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults*. Arteriosclerosis, 1989. 9(1 Suppl): p. 119-32.
38. Paul, O., *Background of the prevention of cardiovascular disease. II. Arteriosclerosis, hypertension, and selected risk factors*. Circulation, 1989. 80(1): p. 206-14.

39. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. 251(4995): p. 788-91.
40. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. 420(6917): p. 868-74.
41. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata*. The Journal of clinical investigation, 2007. 117(1): p. 195-205.
42. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. 473(7347): p. 317-25.
43. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. 105(9): p. 1135-43.
44. Davies, M.J., *A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease*. Circulation, 1990. 82(3 Suppl): p. II38-46.
45. Davies, M.J., *Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995*. Circulation, 1996. 94(8): p. 2013-20.
46. Rajavashisth, T.B., et al., *Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase*. The Journal of biological chemistry, 1999. 274(17): p. 11924-9.
47. Libby, P., *Molecular bases of the acute coronary syndromes*. Circulation, 1995. 91(11): p. 2844-50.
48. Cheng, G.C., et al., *Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation*. Circulation, 1993. 87(4): p. 1179-87.
49. Davies, M.J., *The composition of coronary-artery plaques*. The New England journal of medicine, 1997. 336(18): p. 1312-4.
50. Marx, N., et al., *PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes*. Circulation, 2001. 103(2): p. 213-9.
51. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Physiological reviews, 1999. 79(1): p. 215-62.
52. Tiyyagura, S.R. and S.P. Pinney, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future*. The Mount Sinai journal of medicine, New York, 2006. 73(6): p. 840-51.
53. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. 81(4): p. 1161-72.

54. Jugdutt, B.I., *Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction*. The American journal of physiology, 1997. 272(3 Pt 2): p. H1205-11.
55. Olivetti, G., et al., *Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats*. Circulation research, 1990. 67(1): p. 23-34.
56. Cleutjens, J.P., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1995. 27(6): p. 1281-92.
57. Weisman, H.F. and B. Healy, *Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: pathophysiologic concepts*. Progress in cardiovascular diseases, 1987. 30(2): p. 73-110.
58. Warren, S.E., et al., *Time course of left ventricular dilation after myocardial infarction: influence of infarct-related artery and success of coronary thrombolysis*. Journal of the American College of Cardiology, 1988. 11(1): p. 12-9.
59. Katz, A.M., *Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure*. The New England journal of medicine, 1990. 322(2): p. 100-10.
60. Kajstura, J., et al., *Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1996. 74(1): p. 86-107.
61. Francis, G.S., et al., *The neurohumoral axis in congestive heart failure*. Annals of Internal Medicine, 1984. 101(3): p. 370-7.
62. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. 101(25): p. 2981-8.
63. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, *Liver regeneration*. Science, 1997. 276(5309): p. 60-6.
64. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, *Regenerating the heart*. Nature biotechnology, 2005. 23(7): p. 845-56.
65. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science, 2009. 324(5923): p. 98-102.
66. Bettencourt-Dias, M., S. Mitnacht, and J.P. Brockes, *Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes*. Journal of cell science, 2003. 116(Pt 19): p. 4001-9.
67. Poss, K.D., L.G. Wilson, and M.T. Keating, *Heart regeneration in zebrafish*. Science, 2002. 298(5601): p. 2188-90.

68. Menasche, P., *Skeletal myoblasts as a therapeutic agent*. Progress in cardiovascular diseases, 2007. 50(1): p. 7-17.
69. Gersh, B.J., et al., *Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective*. Mayo Clin Proc, 2009. 84(10): p. 876-92.
70. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. 410(6829): p. 701-5.
71. Kocher, A.A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. Nat Med, 2001. 7(4): p. 430-6.
72. Jackson, K.A., et al., *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. The Journal of clinical investigation, 2001. 107(11): p. 1395-402.
73. Murry, C.E., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. 428(6983): p. 664-8.
74. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. 114(6): p. 763-76.
75. Messina, E., et al., *Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart*. Circ Res, 2004. 95(9): p. 911-21.
76. Kehat, I., et al., *Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. Nature biotechnology, 2004. 22(10): p. 1282-9.
77. Menard, C., et al., *Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study*. Lancet, 2005. 366(9490): p. 1005-12.
78. Swijnenburg, R.J., et al., *Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium*. Circulation, 2005. 112(9 Suppl): p. I166-72.
79. Laflamme, M.A., et al., *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. Nature biotechnology, 2007. 25(9): p. 1015-24.
80. Segers, V.F. and R.T. Lee, *Stem-cell therapy for cardiac disease*. Nature, 2008. 451(7181): p. 937-42.
81. Hochedlinger, K. and R. Jaenisch, *Nuclear reprogramming and pluripotency*. Nature, 2006. 441(7097): p. 1061-7.
82. Eminli, S., R. Jaenisch, and K. Hochedlinger, *Strategies to induce nuclear reprogramming*. Ernst Schering Foundation symposium proceedings, 2006(5): p. 83-98.

83. Yamanaka, S., *Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells*. Cell stem cell, 2007. 1(1): p. 39-49.
84. Brenner, C. and W.M. Franz, *The use of stem cells for the repair of cardiac tissue in ischemic heart disease*. Expert Review of Medical Devices, 2011. 8(2): p. 209-225.
85. Mummery, C., et al., *Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. Journal of anatomy, 2002. 200(Pt 3): p. 233-42.
86. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. 131(5): p. 861-72.
87. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. 292(5819): p. 154-6.
88. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
89. Dai, W., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction*. Transplant immunology, 2005. 15(2): p. 91-7.
90. Huber, I., et al., *Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2007. 21(10): p. 2551-63.
91. Min, J.Y., et al., *Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2003. 125(2): p. 361-9.
92. Nir, S.G., et al., *Human embryonic stem cells for cardiovascular repair*. Cardiovascular research, 2003. 58(2): p. 313-23.
93. Yamada, S., et al., *Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic cardiomyopathy*. Stem Cells, 2008. 26(10): p. 2644-53.
94. Reubinoff, B.E., et al., *Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro*. Nature biotechnology, 2000. 18(4): p. 399-404.
95. Wakitani, S., et al., *Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint*. Rheumatology, 2003. 42(1): p. 162-5.
96. Lee, M.S. and R.R. Makkar, *Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report*. Annals of Internal Medicine, 2004. 140(9): p. 729-37.
97. Xu, X.Q., et al., *Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells*. Differentiation; research in biological diversity, 2008. 76(9): p. 958-70.

98. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. 126(4): p. 663-76.
99. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. Science, 2008. 322(5903): p. 949-53.
100. Kim, D., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. Cell stem cell, 2009. 4(6): p. 472-6.
101. Engelmann, M.G. and W.M. Franz, *Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application?* Curr Opin Mol Ther, 2006. 8(5): p. 396-414.
102. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. 4(1-2): p. 7-25.
103. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche*. Nature, 2001. 414(6859): p. 98-104.
104. Moore, K.A. and I.R. Lemischka, *Stem cells and their niches*. Science, 2006. 311(5769): p. 1880-5.
105. Gong, J.K., *Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells*. Science, 1978. 199(4336): p. 1443-5.
106. Abkowitz, J.L., et al., *Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure*. Blood, 2003. 102(4): p. 1249-53.
107. Watt, F.M. and B.L. Hogan, *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 2000. 287(5457): p. 1427-30.
108. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. Circ Res, 2004. 95(1): p. 9-20.
109. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematol, 2002. 30(8): p. 896-904.
110. Liao, S.Y., et al., *Proarrhythmic risk of embryonic stem cell-derived cardiomyocyte transplantation in infarcted myocardium*. Heart Rhythm, 2010. 7(12): p. 1852-9.
111. Kogler, G., et al., *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential*. J Exp Med, 2004. 200(2): p. 123-35.
112. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. 275(5302): p. 964-7.

113. Orlic, D., *Adult BM stem cells regenerate mouse myocardium*. Cytotherapy, 2002. 4(6): p. 521-5.
114. Orlic, D., et al., *Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. 938: p. 221-9; discussion 229-30.
115. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, *Heart regeneration*. Nature, 2011. 473(7347): p. 326-35.
116. Yoon, Y.S., et al., *Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction*. J Clin Invest, 2005. 115(2): p. 326-38.
117. Gneocchi, M., et al., *Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells*. Nat Med, 2005. 11(4): p. 367-8.
118. Takahashi, M., et al., *Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 291(2): p. H886-93.
119. Gneocchi, M., et al., *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement*. FASEB J, 2006. 20(6): p. 661-9.
120. Gneocchi, M., et al., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. Circulation research, 2008. 103(11): p. 1204-19.
121. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. Circulation, 2002. 106(24): p. 3009-17.
122. Wollert, K.C., et al., *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. Lancet, 2004. 364(9429): p. 141-8.
123. Kang, H.J., et al., *Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial*. Lancet, 2004. 363(9411): p. 751-6.
124. Schachinger, V., et al., *Bone-marrow-derived progenitor cell therapy in need of proof of concept: design of the REPAIR-AMI trial*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. 3 Suppl 1: p. S23-8.
125. Menasche, P., et al., *Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction*. Journal of the American College of Cardiology, 2003. 41(7): p. 1078-83.

126. Siminiak, T., et al., *Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial*. Eur Heart J, 2005. 26(12): p. 1188-95.
127. Perin, E.C., et al., *Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure*. Circulation, 2003. 107(18): p. 2294-302.
128. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet, 2003. 362(9385): p. 697-703.
129. Moelker, A.D., et al., *Intracoronary delivery of umbilical cord blood derived unrestricted somatic stem cells is not suitable to improve LV function after myocardial infarction in swine*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2007. 42(4): p. 735-45.
130. Vulliet, P.R., et al., *Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs*. Lancet, 2004. 363(9411): p. 783-4.
131. Mansour, S., et al., *Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. 47(8): p. 1727-30.
132. Beeres, S.L., et al., *Cell therapy for ischaemic heart disease*. Heart, 2008. 94(9): p. 1214-26.
133. Kornowski, R., et al., *Evaluation of the acute and chronic safety of the biosense injection catheter system in porcine hearts*. Catheter Cardiovasc Interv, 1999. 48(4): p. 447-53; discussion 454-5.
134. Sandri, M., et al., *Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies*. Circulation, 2005. 111(25): p. 3391-9.
135. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med, 1999. 5(4): p. 434-8.
136. Shintani, S., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. Circulation, 2001. 103(23): p. 2776-9.
137. Numaguchi, Y., et al., *The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction*. Circulation, 2006. 114(1 Suppl): p. I114-9.
138. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. N Engl J Med, 2005. 353(10): p. 999-1007.

139. Schmidt-Lucke, C., et al., *Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair*. Circulation, 2005. 111(22): p. 2981-7.
140. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. 89(1): p. E1-7.
141. Fadini, G.P., et al., *Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus*. Journal of the American College of Cardiology, 2005. 45(9): p. 1449-57.
142. Laufs, U., et al., *Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis*. Circulation, 2004. 109(2): p. 220-6.
143. Wang, Y., et al., *Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention*. Heart, 2006. 92(6): p. 768-74.
144. Massa, M., et al., *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction*. Blood, 2005. 105(1): p. 199-206.
145. Vose, J.M., et al., *The use of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor for the treatment of delayed engraftment following high dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for lymphoid malignancies*. Bone Marrow Transplant, 1991. 7(2): p. 139-43.
146. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol, 2002. 3(7): p. 687-94.
147. Levesque, J.P., et al., *Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide*. J Clin Invest, 2003. 111(2): p. 187-96.
148. Christopherson, K.W., et al., *CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26^{-/-} mice*. Experimental hematology, 2003. 31(11): p. 1126-34.
149. Jin, F., et al., *Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization*. Bone Marrow Transplant, 2008. 42(9): p. 581-8.
150. Levesque, J.P., et al., *Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow*. Stem Cells, 2007. 25(8): p. 1954-65.

151. Smart, N. and P.R. Riley, *The stem cell movement*. Circ Res, 2008. 102(10): p. 1155-68.
152. Zaruba, M.M. and W.M. Franz, *Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy*. Expert Opin Biol Ther, 2010. 10(3): p. 321-35.
153. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(18): p. 10344-9.
154. Valgimigli, M., et al., *Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile*. Eur Heart J, 2005. 26(18): p. 1838-45.
155. Ripa, R.S., et al., *Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial*. Circulation, 2006. 113(16): p. 1983-92.
156. Zohnhofer, D., et al., *Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial*. JAMA, 2006. 295(9): p. 1003-1010.
157. Ince, H., et al., *Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial*. Circulation, 2005. 112(9 Suppl): p. I73-80.
158. Harada, M., et al., *G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes*. Nat Med, 2005. 11(3): p. 305-11.
159. Heeschen, C., et al., *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization*. Blood, 2003. 102(4): p. 1340-6.
160. Brunner, S., et al., *Migration of bone marrow-derived cells and improved perfusion after treatment with Erythropoietin in a murine model of myocardial infarction*. Journal of cellular and molecular medicine, 2011.
161. Bodine, D.M., et al., *In vivo administration of stem cell factor to mice increases the absolute number of pluripotent hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. 82(2): p. 445-55.
162. Gill, M., et al., *Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells*. Circ Res, 2001. 88(2): p. 167-74.

163. Laterveer, L., et al., *Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability*. Blood, 1995. 85(8): p. 2269-75.
164. Hattori, K., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2001. 193(9): p. 1005-14.
165. Ceradini, D.J. and G.C. Gurtner, *Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue*. Trends Cardiovasc Med, 2005. 15(2): p. 57-63.
166. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nature medicine, 2004. 10(8): p. 858-64.
167. Theiss, H.D., et al., *Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis*. Stem Cell Res, 2011. 7(3): p. 244-55.
168. Christopherson, K.W., 2nd, et al., *Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26*. Science, 2004. 305(5686): p. 1000-3.
169. Zaruba, M.M., et al., *Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction*. Cell stem cell, 2009. 4(4): p. 313-23.
170. Mannstadt, M., H. Juppner, and T.J. Gardella, *Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties*. Am J Physiol, 1999. 277(5 Pt 2): p. F665-75.
171. Stanislaus, D., V. Devanarayan, and J.M. Hock, *In vivo comparison of activated protein-1 gene activation in response to human parathyroid hormone (hPTH)(1-34) and hPTH(1-84) in the distal femur metaphyses of young mice*. Bone, 2000. 27(6): p. 819-26.
172. Brown, E.M., et al., *Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid*. Nature, 1993. 366(6455): p. 575-80.
173. Bringhurst, F.R., et al., *Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo*. Am J Physiol, 1988. 255(6 Pt 1): p. E886-93.
174. Collip, J.B., *Clinical Use of the Parathyroid Hormone*. Canadian Medical Association Journal, 1925. 15(11): p. 1158.
175. Throckmorton, D., et al., *Parathyroid hormone effects on signaling pathways in endothelial cells vary with peptide concentration*. Peptides, 2002. 23(1): p. 79-85.

176. Schluter, K.D. and H.M. Piper, *Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide*. Cardiovasc Res, 1998. 37(1): p. 34-41.
177. Lafferty, F.W., *Primary hyperparathyroidism. Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension, and discriminant analysis of laboratory tests*. Arch Intern Med, 1981. 141(13): p. 1761-6.
178. Piovesan, A., et al., *Left ventricular hypertrophy in primary hyperparathyroidism. Effects of successful parathyroidectomy*. Clin Endocrinol (Oxf), 1999. 50(3): p. 321-8.
179. London, G.M., et al., *Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2004. 15(7): p. 1943-51.
180. Schluter, K.D., R. Schreckenber, and S. Wenzel, *Stem cell mobilization versus stem cell homing: potential role for parathyroid hormone?* Cardiovasc Res, 2008. 77(4): p. 612-3.
181. Feola, M., H. Gonzales, and P.C. Canizaro, *Vasoactive parathyroid hormone in the treatment of acute ischemic left ventricular failure and the prevention of cardiogenic shock*. Circ Shock, 1985. 17(2): p. 163-77.
182. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. 425(6960): p. 836-41.
183. Kiger, A.A., et al., *Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue*. Science, 2001. 294(5551): p. 2542-5.
184. Weber, J.M., et al., *Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells*. Bone, 2006. 39(3): p. 485-93.
185. Visnjic, D., et al., *Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency*. Blood, 2004. 103(9): p. 3258-64.
186. Ballen, K.K., et al., *Phase I trial of parathyroid hormone to facilitate stem cell mobilization*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. 13(7): p. 838-43.
187. Huber, B.C., et al., *Comparison of parathyroid hormone and G-CSF treatment after myocardial infarction on perfusion and stem cell homing*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 298(5): p. H1466-71.
188. Lieschke, G.J., et al., *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. Blood, 1994. 84(6): p. 1737-46.
189. Baan J, J.T., Kerkhof PL, Moene RJ, van Dijk AD, van der Velde ET, Koops J., *Continuous stroke volume and cardiac output from intra-ventricular dimensions obtained with impedance catheter*. Cardiovasc Res. , 1981. 6(15): p. 328-34.

190. W. Böcker HD, P.U.H., *Pathologie, Vol. 3, völlig überarbeitete Auflage*. 2004.
191. Romeis, B., *Mikroskopische Technik, Vol.17, neubearbeitete Auflage*. 1989: p. 497-499.
192. DeLisser, H.M., et al., *Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis*. The American journal of pathology, 1997. 151(3): p. 671-7.
193. Newman, P.J., *The biology of PECAM-1*. The Journal of clinical investigation, 1997. 99(1): p. 3-8.
194. Ismail, J.A., et al., *Immunohistologic labeling of murine endothelium*. Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology, 2003. 12(2): p. 82-90.
195. Parums, D.V., et al., *JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections*. Journal of clinical pathology, 1990. 43(9): p. 752-7.
196. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. The American journal of pathology, 1995. 146(1): p. 3-15.
197. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. The Journal of cell biology, 1992. 119(3): p. 493-501.
198. R&DSystems, *Quantikine Mouse CXCL12/SDF-1 alpha Immunoassay*, 2004, Minneapolis, USA.
199. Deindl, E., et al., *G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis*. FASEB J, 2006. 20(7): p. 956-8.
200. Brunner, S., et al., *G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells*. Exp Hematol, 2008. 36(6): p. 695-702.
201. Shim, W., et al., *G-CSF for stem cell therapy in acute myocardial infarction: friend or foe?* Cardiovascular research, 2011. 89(1): p. 20-30.
202. Zaruba, M.M., et al., *Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival*. Cardiovasc Res, 2008.
203. Huber, B.C., et al., *Comparison of parathyroid hormone and G-CSF treatment after myocardial infarction on perfusion and stem cell homing*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2010. 298(5): p. H1466-71.
204. Brunner, S., et al., *Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow*. Exp Hematol, 2008.

205. Theiss, H.D., et al., *Dual stem cell comprising administration of G-CSF and sitagliptin improves stem cell homing, cardiac function and survival after MI in mice*. European Heart Journal, 2010. 31: p. 20-20.
206. Theiss, H.D., et al., *Safety and efficacy of SITagliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis*. International Journal of Cardiology, 2010. 145(2): p. 282-4.
207. Honold, J., et al., *Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(10): p. 2238-43.
208. Schuster, M.D., et al., *Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 287(2): p. H525-32.
209. Majka, M., et al., *Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner*. Blood, 2001. 97(10): p. 3075-85.
210. Napoli, C., et al., *Therapeutic targeting of the stem cell niche in experimental hindlimb ischemia*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008. 5(9): p. 571-9.
211. Kawamoto, A., et al., *CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells*. Circulation, 2006. 114(20): p. 2163-9.
212. Zaruba, M.M. and W.M. Franz, *Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy*. Expert Opin Biol Ther. 10(3): p. 321-35.
213. Saxena, A., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction*. Circulation, 2008. 117(17): p. 2224-31.
214. Michael, L.H., et al., *Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model*. Am J Physiol, 1995. 269(6 Pt 2): p. H2147-54.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACI	Arteria carotis interna
AS	Aminosäure
BMC	Knochenmarksstammzelle
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD26	Dipeptidylpeptidase IV; DPP-IV
CO	Cardiac Output
CXCL12	Stromal Cell Derived Factor 1; SDF-1
CXCR-4	Chemokin Rezeptor Typ 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase IV; CD26
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
EPO	Erythropoetin
ESV	Endsystolisches Volumen
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GLP-1	Glucagone Like Peptide 1
HF	Herzfrequenz
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor-1
HMV	Herzminutenvolumen
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen; Herzminutenvolumen
i.p.	intraperitoneal
ICM	ischämische Kardiomyopathie
ICR	Intercostalraum
IL	Interleukin
iPS	induzierte pluripotente Stammzelle
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzerkrankung
KO	Knock-Out
LAD	Left Anterior Descending Coronary Artery
LDL	Lipoprotein niederer Dichte
LV	Linker Ventrikel; linksventrikulär
MI	Myokardinfarkt
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9

MMP-9	Matrix-Metalloproteinase
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PerCP	Peridinin Chlorophyll-A-Protein
pHPT	primärer Hyperparathyreoidismus
PKC	Proteinkinase C
PTCA	Percutaneus Transluminal Coronary Angioplastie
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormone-related Peptide
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor-1; CXCL12
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SV	Schlagvolumen
TGF- β	Tumor Growth Faktor beta
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TUNEL	Terminal Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungslabor von Prof. Dr. Wolfgang-Michael Franz in der Medizinischen Klinik I des Klinikum Großhadern (Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg) durchgeführt.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Franz für die Überlassung des spannenden Forschungsthemas und das in mich gelegte Vertrauen bedanken. Überdies danke ich Prof. Franz für die Einführung in das wissenschaftliche Denken und Arbeiten.

Bei Herrn PD Dr. med. Stefan Brunner möchte ich mich für die intensive und fachkundige Betreuung bedanken. In den zahlreichen konstruktiven Gesprächen stand er mir durch seine kompetente und anspornende Hilfestellung bei den wissenschaftlichen Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten sind, stets zur Seite.

Bei Herrn Prof. Müller-Hocker sowie Frau PD Dr. Nadja Herbach möchte ich mich für die Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen und Auswertungen bedanken.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei den Medizinisch-Technischen Assistentinnen (insbesondere bei Frau Judith Arcifa, Barbara Markieton sowie Sandra Junker) für die professionelle Zusammenarbeit aber auch für die ermunternden Worte in den Durststrecken der Laborarbeit bedanken.

Auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Franz gilt mein Dank für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei der Rudolf-und-Brigitte-Zenner-Stiftung möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Zu guter Letzt gilt ein großer Dank meiner Familie für die Unterstützung sowie den Rückhalt während des Studiums sowie der Promotion.

Eidesstattliche Versicherung

Tobias Weinberger

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Freisetzung von endogenem G-CSF als möglicher Mechanismus der kardioprotektiven
Effekte von PTH

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand